

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

The manufacturing method and usage I. of plasma protein liquid pharmaceutical preparation Field of invention This invention relates to the manufacturing method and usage of the liquid pharmaceutical preparation of plasma protein, especially blood coagulation factor liquid pharmaceutical preparation. When it states more concretely, this invention relates to the treatment of the inherency by injecting with or pouring in these pharmaceutical preparation continuously so that the coagulation factor level concerned in liquid pharmaceutical preparation with stable Factor VIII and Factor IX and blood may become fixed, or a acquired plasma protein deficiency disease.

II. Background of invention A. Coagulation Fixed blood protein interacts in the cascade of proteolysis-activation, and the coagulation of blood takes place according to an "internal cause system path" or an "external cause system path" of finally changing a fusibility fibrinogen into an insoluble fibrin. These fibrin fiber constructs a bridge and forms the scaffold of a clot. Coagulation cannot take place without fibrin generation.

Proteolysis-activation of the : (1) factor XII which an internal cause system path becomes from seven next steps; when; (3) active-type factor XI to which (2) active type factors XII cut Factor XI, and activate it cuts Factor IX Cutting of Factor X when (4) active type factors IX interact with the active factor VIII; which activates it -- (Five) active type factors X combine with the active factor V on the front face of the film. activated; -- ; (7) fibrin monomer which; (6) thrombin which the complex cuts prothrombin in proteolysis and makes generate a thrombin cuts a fibrinogen in proteolysis, and makes generate a fibrin meets, and it becomes fibril. A bridge is constructed over it by Factor XIII. If : (1) blood vessel which an external cause system path becomes from the next phase explodes, the; (3) factor VIIa-**** factor complex activated by Factor VIIa by proteolysis-cutting will cut Factor X, and will activate the; (2) factor VII combined with the **** factor which is the lipoprotein to which Factor VII exists in **** besides a blood circulatory system. It is the same as an internal cause system path after that [of an external cause system path].

That is, these two paths share the three-stage of the above-mentioned last.

After one of the plasma protein and a coagulation factor IX ("CFIX") are compounded by hepatocyte as a 415 amino-acid polypeptide by liver, posttranslational modification of them is carried out to a glycoprotein with a molecular weight of 56,000dalton by the carboxylase which requires a vitamin K as cofactor. Therefore, CFIX is one of the "vitamin K dependency" plasma protein groups.

Factor VII is another vitamin K dependency coagulation protein with the size similar to CFIX, and structure.

The non-vitamin K dependency protein factor VIII is far large protein, is in 300,000dalton (300kDa) **, and has molecular weight. This is activated by the thrombin. A thrombin makes Factor VIIIa (active type) generate by cutting Factor VIII by several places. In plasma, it combines with a von Willebrand factor (vWF), and Factor VIII circulates as complex with vWF which stabilizes an unstable factor VIII molecule.

Various coagulopathies will be encountered if the balance of the cascade which participates in an internal cause system path is disturbed. The deficit or reduction of a phase (4) of an internal cause system factor X activation component ("TENAZE (tenase)") brings about the coagulation state of impairment known as a hemophilia.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-515460
(P2001-515460A)

(43) 公表日 平成13年9月18日 (2001.9.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 6 1 K 35/16		A 6 1 K 35/16	
9/08		9/08	
38/22		47/02	
47/02		47/18	
47/18		A 6 1 P 7/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 80 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平9-520742
(86) (22) 出願日 平成8年12月2日 (1996.12.2)
(85) 翻訳文提出日 平成10年6月1日 (1998.6.1)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 6 / 1 9 2 5 1
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 1 9 6 8 7
(87) 国際公開日 平成9年6月5日 (1997.6.5)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 0 7 , 8 6 6
(32) 優先日 平成7年12月1日 (1995.12.1)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 0 8 / 7 5 8 , 5 6 0
(32) 優先日 平成8年11月29日 (1996.11.29)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ジ・アメリカン・ナショナル・レッド・クロ
ロス
アメリカ合衆国20006ワシントン・ディ
ストリクト・オブ・コロンビア、ノース・ウ
エスト、セブンティーンズ・ストリート
430番、ナショナル・ヘッドクォーターズ
(71) 出願人 ザ・コーリション・フォー・ヘモフィリ
ア・ピー・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国10019ニューヨーク州 ニ
ューヨーク、フィフス・アベニュー712番、
フォーティサード・フロアー
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血漿タンパク質液体製剤の製造法と使用法

(57) 【要約】

本発明は血漿タンパク質液体製剤、特に血液凝固因子液
体製剤の製造と使用に関する。より具体的には、本発明
は、血中に一定なレベルの凝固因子を与えるために注射
または注入によって投与することができる因子VIIIおよ
び因子IXの安定な液体製剤に関する。

【特許請求の範囲】

1. (a) 血漿タンパク質、(b)pH緩衝化合物、(c) 多価金属イオンの発生源、
(d) 浸透性調節剤および(c) 水を含む、血漿タンパク質の安定な水系液体製剤。
。
2. 多価金属イオンの発生源がカルシウムイオンの発生源である請求項1の製剤。
3. 該血漿タンパク質がビタミンK依存性血漿タンパク質である請求項1の製剤。
4. 該ビタミンK依存性血漿タンパク質が、因子II、因子VII、因子IX、因子X、プロテインC、プロテインSおよびプロテインZからなる群より選択される請求項3の製剤。
5. 該血漿タンパク質が非ビタミンK依存性血漿タンパク質である請求項1の製剤。
6. 該非ビタミンK依存性血漿タンパク質が、因子VIIIおよびフォン・ヴィレブランド因子からなる群より選択される請求項5の製剤。
7. 該pH緩衝化合物がアミノ酸である請求項1の製剤。
8. 該アミノ酸がヒスチジンである請求項7の製剤。
9. 浸透性調節剤が塩化ナトリウム (NaCl) である請求項1の製剤。
10. 該カルシウムイオンの発生源が塩化カルシウム (CaCl₂) である請求項2の製剤。
11. (a) 血漿タンパク質および (b) 非水系液体を含む、血漿タンパク質の安定な非水系液体製剤。
12. 該非水系液体が親水性非水系液体である請求項11の製剤。
13. 該非水系液体が、グリセロール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、PEG200、PEG300、PEG400、ジプロピレングリコール、トリプロピレングリコール、PPG425、PPG725、PPG1000、PPG2000、PPG3000およびPPG4000からなる群より選択される請求項11の製剤。

14. 該血漿タンパク質がビタミンK依存性血漿因子である請求項11の製剤。
15. 該ビタミンK依存性血漿タンパク質が、因子II、因子VII因子IX、因子X、プロテインC、プロテインSおよびプロテインZからなる群より選択される請求項14の製剤。
16. 該血漿タンパク質が非ビタミンK依存性血漿タンパク質である請求項11の製剤。
17. 該非ビタミンK依存性血漿タンパク質が、因子VIIIおよびフォン・ヴィレブランド因子からなる群より選択される請求項16の製剤。
18. (a) 血漿タンパク質、(b) 非水系液体および(c) 水を含む、血漿タンパク質の安定な水系/非水系混合液体製剤。
19. 先天性または後天性血漿タンパク質欠乏症の治療法であって、その必要がある患者に請求項1、請求項11および請求項18のいずれかの製剤を投与することからなる方法。
20. 該投与が持続注射または持続注入によってなされる請求項19の方法。
21. 該投与が生体再吸収性ヒドロゲルからの拡散によってなされる請求項19の方法。

【発明の詳細な説明】**血漿タンパク質液体製剤の製造法と使用法****I. 発明の分野**

本発明は血漿タンパク質の液体製剤、特に血液凝固因子液体製剤の製造法と使用法に関する。より具体的に述べると、本発明は、因子VIIIおよび因子IXの安定な液体製剤、および血中の当該凝固因子レベルが一定となるようにそれら製剤を持続的に注射または注入することによる先天性または後天性血漿タンパク質欠乏症の処置に関する。

II. 発明の背景**A. 凝固**

血液の凝固は、タンパク質分解的活性化のカスケードで一定の血液タンパク質が相互作用し、最終的に可溶性フィブリノーゲンを不溶性フィブリンに変換する"内因系経路"または"外因系経路"によって起こる。これらのフィブリン繊維は架橋して血餅の足場を形成する。フィブリン生成がなければ、凝固は起こり得ない。

内因系経路は次に挙げる7段階からなる：(1)因子XIIのタンパク質分解的活性化；(2)活性型因子XIIが因子XIを切断してそれを活性化する；(3)活性型因子XIが因子IXを切断することにより、それを活性化する；(4)活性型因子IXが活性型因子VIIIと相互作用することにより因子Xを切断、活性化する；(5)活性型因子Xが膜表面の活性型因子Vに結合し、その複合体がプロトロンビンをタンパク質分解的に切断してトロンビンを生成させる；(6)トロンビンがタンパク質分解的にフィブリノーゲンを切断してフィブリンを生成させる；(7)フィブリン単量体が会合してフィブリルになり、それが因子XIIIによって架橋される。

外因系経路は次の段階からなる：(1)血管が破裂すると、因子VIIが血管系外の組織中に存在するリポタンパク質である組織因子に結合する；(2)因子VIIはタンパク質分解的切断により因子VIIaに活性化される；(3)因子VIIa-組織因子複合体が因子Xを切断、活性化する。外因系経路のその後は内因系経路と同じである。すなわちこれら2つの経路は、上述の最後の3段階を共有する。

血漿タンパク質の一つ、凝固因子IX ("CFIX") は、肝臓で肝細胞により415アミノ酸ポリペプチドとして合成された後、補因子としてビタミンKを要求するカルボキシラーゼにより分子量56,000ダルトンの糖タンパク質に翻訳後修飾される。したがってCFIXは"ビタミンK依存性"血漿タンパク質群の一つである。

因子VIIは、CFIXに似たサイズと構造を持つもう1つのビタミンK依存性凝固タンパク質である。

非ビタミンK依存性タンパク質因子VIIIは、はるかに大きいタンパク質で、300,000ダルトン (300kDa) 近い分子量を持つ。これはトロンビンによって活性化される。トロンビンは因子VIIIを数箇所切断することにより、因子VIIIa (活性型) を生成させる。血漿中では、因子VIIIはフォン・ヴィレブランド因子 (vWF) に結合し、不安定な因子VIII分子を安定化するvWFとの複合体として循環する。

内因系経路に関与するカスケードの平衡が乱されると、種々の凝固障害が起こる。段階(4)の内因系因子X活性化成分 ("テナーゼ(tenase)") の欠損または減少は、血友病として知られる凝固欠陥状態をもたらす。最も一般的な血友病Aは因子VIII遺伝子中の突然変異によって起こり、クリスマス病とも呼ばれる血友病Bは因子IX遺伝子中の突然変異によって起こる。血友病Bは血友病Aと同様にX連鎖性で、血友病症例の約12%を占める。その症状は血友病Aの症状と同じで、損傷時の過剰な出血と自然出血 (特に体重保持関節、軟部組織および粘膜への自然出血) である。関節内への出血を繰り返すと関節血症が起こって、肢体を不自由にする有痛性の関節症となり、これはしばしば関節置換術を必要とする。軟部組織内の血腫は壊死性血塊からなる擬似腫瘍をもたらす得る。それらは隣接する器官を閉塞、圧迫し、あるいは隣接する器官内に破裂し、感染症につながりうる。いったん生成した血腫は外科手術を行っても治療することが難しい。圧迫後の神経の回復は不十分で、麻痺状態をもたらす。胃腸路、中枢神経系または気道/腹膜後隙でこれらの出血エピソードが起こると、たとえ検出されなくても、死に至ることがある。頭蓋内出血は血友病患者の主な死因である。

現在行われているこれら症状の治療は、因子VIIIまたは因子IX濃縮物の静脈

内補充療法からなる。大きな出血エピソードの治療は濃縮物のボラス注射によって行われる。しかし上述のように、直ちに検出し治療したとしても、組織損傷は残る。この痛みと衰弱を予防するには、予防的処置が推奨される。因子IXを注射すると、その50%は直ちに血管内皮細胞に結合し、かつ／または、血管外腔に拡散する。残りの50%は循環系内で約24時間の半減期を持つ。因子IXはこのような注入動態を持つので、血漿中に最低限の治療レベルを維持するには、毎週1回か2回あるいはそれ以上の頻度で注射を行なう必要がある。この措置は患者にとっては不便でありストレスにもなるのだが、それでも十分に有効なわけではない。治療を開始する前に起こった各出血エピソードごとに、累進的累積的な組織損傷が続く。

B. ビタミンK依存性血漿タンパク質

ビタミンK依存性血漿タンパク質を含むグループは、現在までのところ、因子II、因子VII、因子IX、因子X、プロテインC、プロテインS、およびプロテインZからなる。。これらのタンパク質は遺伝子構成、アミノ酸配列（一次構造）、タンパク質の折りたたみ（二次構造）、翻訳後修飾、活性化、および機能のどのレベルでも、かなりの相同性を示す（C.R.Sriverら共編, *Metabolic Basis of Inherited Disease*（遺伝性疾患の代謝的基礎）, 第6版（出版社McGraw-Hill, ニューヨーク州ニューヨーク）(1989)の第84章, HednerおよびDavie著, *Introduction to Hemostasis and the Vitamin K-Dependent Coagulation Factors*（止血とビタミンK依存性凝固因子の概説）, p2107-2134）。次の表は、よく特徴づけられた6つのビタミンK依存性血漿タンパク質の特性を比較したものである（プロテインZはその性質と機能に関する情報が十分でないので、この比較から除外した）：

特性	因子 II	因子 VII	因子 IX	因子 X	プロテインC	プロテインS
glut ⁺ メイン数	10	10	12	11	9	11
EGFドメイン (含β)数	2 クリングル	2	2	2	2	4 β
活性化切断 機能	Xa で 2 セリン プロテアーゼ	Xa で 1 セリン プロテアーゼ	XIa で 2 セリン プロテアーゼ	IXa で 2 セリン プロテアーゼ	IIa で 1 セリン プロテアーゼ	補因子, プロテインC
触媒ドメイン	His43 Asp99 Ser205	His41 Asp90 Ser192	His41 Asp89 Ser185	His42 Asp88 Ser185	His42 Asp88 Ser91	—
炭水化物数	3	3	2	2	4	3

"glut"ドメインは、ビタミンKを要求する膜結合型複合体がアミノ酸であるグルタミン酸をカルボキシル化することによって形成される複数のγ-カルボキシグルタミン酸残基を持つ最初の40~45アミノ酸残基からなる。これらは、リン脂質表面に対するそのタンパク質のカルシウム依存的結合に必要である。

"EGF"ドメインは、上皮細胞増殖因子 (EGF) とその前駆体にかなり似た配列を持つ40~50アミノ酸からなる。これらの各タンパク質中の最初のEGFドメインは、β-ヒドロキシアスパラギン酸変異を含有する。プロテインSはこれらのEGFドメインを含有しないが、3つのβ-ヒドロキシアスパラギン酸残基と1つのβ-ヒドロキシアスパラギン残基を含有する。プロトロンビンとも呼ばれる因子IIは、これらEGFドメインの代わりに2つのクリングル領域を含有する。これらのクリングルドメインは、ビタミンK依存性タンパク質ではないがタンパク質分解活性を持ち凝固に関与する血漿タンパク質因子XII、プラスミノゲン、組織プラスミノゲン活性化因子およびウロキナーゼにも認められる。

上記6つのビタミンK依存性血漿タンパク質のうち5つは、先行する凝固カスケード成分によってタンパク質分解的に切断される。3つのビタミンK依存性血漿タンパク質は2ヶ所で切断され、触媒ドメインを遮蔽していた活性化ペプチドを放出する。因子IXaによる因子Xの活性化は、この2本鎖タンパク質の重鎖から活性化ペプチドを放出させる単切断を伴う。因子VIIは、そのポリペプチドの一本鎖の単切断によって、活性化ペプチドを放出することなく活性化される。

上記6つのビタミンK依存性血漿タンパク質のうち5つは、活性化されるとセ

リンプロテアーゼになる。これらのプロテアーゼはその触媒ドメイン内の類似する位置にヒスチジン、アスパラギン酸およびセリン残基を持つ。プロテインSはプロテインCの補因子であり、それ自身が触媒ドメインを持つことは現在のところ知られていない。

上記6つのビタミンK依存性血漿タンパク質は2~4個のN結合型グリコシル化部位をそのEGFドメインと触媒ドメインおよび/または活性化ペプチド内に持つ糖タンパク質である。

これらのビタミンK依存性血漿タンパク質はきわめてよく似た特徴を持つので、その精製法のほとんどで同時精製される。6つのビタミンK依存性血漿タンパク質はすべて、一般に使用される精製法のどちらでも、ほとんどの段階で同じ画分中に認められる。コーン画分をクエン酸バリウムまたは水酸化アルミニウム吸着によって精製すると、因子II、VII、IXおよびXならびにプロテインCが同時精製される。凍結乏血漿をDEAE-セファデックスやDEAE-セファロースのような樹脂での陰イオン交換クロマトグラフィーにかけると、因子II、IXおよびXが痕跡量の因子VIIおよびプロテインCと共に同時精製される。

C. 現行の因子IX製剤

米国市場に因子IX濃縮物を出している2社は、それらを凍結乾燥体として提供している。Armour Pharmaceuticals社（現在Centeon社）が生産しているモノニン（Mononine）は、滅菌注射水（WFI）で復元した後、0.01モル/リットル（mol/L）ヒスチジン、pH7.05、0.066mol/L塩化ナトリウム、3%マンニトールの組成で送達される。アルファナインSD（AlphaNine SD）はAlpha Therapeutics社が製造しており、これは滅菌WFIで復元した後、0.04単位ヘパリン/単位-因子IXと1mgブドウ糖/単位-因子IXを含む組成で送達される。モノニンのあるロットは、復元すると37℃で13日間の試験管内半減期を持つことがわかった。現行の予防療法に認められるような侵襲的処置の反復を避けるには、37℃で少なくとも30日間、4℃で少なくとも365日間の安定性が必要である。

D. 現行の因子VIII製剤

3社が米国市場用のアフィニティー精製血漿因子VIII濃縮物を生産しており、

それらはいずれも凍結乾燥製品である。Baxter Healthcare/Hyland Division社は同じ方法で2つの製品を製造している。すなわち、抗血友病因子（ヒト）M法モノクローナル精製品（Antihemophilic Factor(Human), Method M, Monoclonal Purified; AHF-M）は米国赤十字社（ARC）が集めた献血血漿からARCのために生産されており、ヘモフィルM（Hemophil M）は商業的な血漿交換血漿から生産されている。これらの製品は、滅菌WFIで復元した後、12.5mg/mLヒトアルブミン、1.5mg/mL PEG、0.030Mグリシンおよび0.055Mヒスチジンという組成で送達される。Armour/Centeon社が生産しているモノクレイト（Monoclait）は、滅菌WFIで復元した後、10~20mg/mLヒトアルブミン、0.30~0.45M塩化ナトリウム、2~5mM塩化カルシウム、0.8%マンニトールおよび1.2mMヒスチジンという組成で送達される。Alpha Therapeutic Corporation社が製造しているアルファネイト（Alphanate）は、滅菌WFIで復元した後、ヒトアルブミンが0.5~10mg/mLであり、かつ、10mMカルシウム、2 μ /mLヘパリン、0.055Mヒスチジンおよび0.3Mアルギニンを超えない組成で送達される。

また、2つの凍結乾燥組換え因子VIII製品も現在市場に出されている。リコネイト（Recombinate）はBaxter HealthCare社が、コージネイト（Kogenate）はBayer Corporation社がそれぞれ生産している。

E. その他の安定な水系血漿タンパク質製剤

フィブリン封鎖剤（シーラント）またはフィブリン接着剤の成分は、トロンビン濃縮物成分もフィブリノーゲン濃縮物成分も、その半減期が4℃で6ヶ月以上の液体として製剤化されている（Chabbatら, *Thrombos. Res.* 76:525-533(1994)）。トロンビン成分は、アルギニン1.6ミリモル/リットル（mmol/L）、ベンズアミジン1mg/L未満、グルコン酸1.7mmol/L、カルシウム22mmol/L、pH6.6の製剤中にある。フィブリノーゲン濃縮成分は、アプロチニン250Kiu/ミリリットル（Kiu/mL）、グリシン1.2グラム/リットル（g/L）、エタノール0.1g/L未満、pH7.6の製剤中にある。

P. 非水系液体タンパク質製剤

非水系液体製剤中の医薬的に重要なタンパク質製剤はほとんど先例がない。し

かし、フィブリンシーラント (Fibrin Sealant) の成分であるフィブリノーゲンとトロンビン (活性型因子II) は、それらの成分が早期活性化を起こすことなく一送達単位ずつ容易に保存および送達できるように、非水系エタノール溶液中に調剤されている。

G. 持続注入による医薬製剤の送達

液体製剤中の医薬の持続送達にはポンプが使われてきた。インスリン、抗生物質、化学療法剤、ホルモンの送達には、米国内外で、体外型シリンジ送達ポンプが使用されている。これらのポンプは静脈内、皮下または腹腔内に、必要に応じてプログラムされた持続投与もしくはボーラス注射として、液体を送達できる。貯蔵槽の容量は1ミリリットルから1500ミリリットルの範囲にわたる。これらのポンプは2~3ヶ月の寿命を持つ電池で駆動される。したがって因子IX液体製剤は、現行の予防療法のように週2回ではなく、月に1回医師の監督を受けねばすむように、37℃で少なくとも30日の安定性を持つことが望ましい。このタイプの体外装着ポンプは、予防措置を講じなければ侵襲的処置によって起こってしまうかもしれない過剰な出血を予防するために手術前後の短期予防として、因子VIIIと因子IXを血友病患者に送達するのに使用されてきた。

また、ヒト体内で使用できる移植用ポンプも2種類あるが、これらは血友病患者に凝固因子を送達するためには使用されていない。これらのポンプは、腹膜、肝動脈または脊髄周辺アクセス用に固定された排出力テーテルと共に胸壁または腹部に外科的に移植され、皮下脂肪で保護されるように設計されている。これらのポンプは外部から注射によって皮膚を通して充填される。アローモデル3000移植用ポンプ (Arrow Model 3000 Implantable Pump; Arrow Therix社, メリーランド州ウォルポール) は臨床使用が認可されており、主として鎮痛剤や肝臓癌用化学療法剤の送達に利用されている。これは30mLの容量を持つチタン製ベローによって稼動し、設定流速0.5、1.0および2.0mL/日の3種類を入手することができる。ミニメッド2001 (MiniMed 2001; MiniMed Technologies社, カリフォルニア州シルマー) はインスリンの送達に使用するための認可を待っていると

ころである。この蠕動ポンプは容量15~18mLのチタン製貯蔵槽をもち、プログラ

ム可能な発信機で外部から制御することができ、必要な時に流速の変更やボラスオーバーライドが可能である。

ヒドロゲル、特にキチンヒドロゲルやキトサンヒドロゲルは、過去に薬物の徐放に使用されたことがある (ChandyおよびSharma, *Biomat. Art. Cells. & Immob. Biotech.* 19:745-760(1991))。最近になって、因子IXが組み込まれた負に荷電したキトサン誘導体N,O-カルボキシメチルキトサン (NOCC) の皮下注射剤から因子IXを生体内で放出させると、そのヒドロゲルからの緩慢な拡散的放出によって因子IXが血漿中に現れ、しかも、その極大レベルは因子IXをこのヒドロゲルなしで直接皮下注射した場合より低く、正常レベルに近くなることがわかった。またこれによって、臨床的に有意なレベルの因子IXがより長期間送達された (1995年6月11日にイスラエルのエルサレムで開催された第15回血栓症と止血に関する国際学会 (XVth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis) での口頭発表)。

III. 発明の要旨

したがって本発明の目的は、一定した循環レベルの凝固因子を与えるために個体に投与することができる因子VIIIと因子IXの安定な液体製剤を提供することである。本発明のその他の目的、特徴および利点は、後述の好ましい態様の詳細な説明に記述する。またその一部は、その記述から明らかになるだろうし、あるいは本発明を実施すればわかるだろう。本発明のこれらの目的と利点は、本明細書の説明とその請求の範囲に詳述する組成物および方法によって実現され、達成される。

本発明液体製剤の有効性は、そのタンパク質そのものに固有の特徴と、生物活性を決定するそれらの特徴を維持する本発明製剤の能力によって決まる。

一態様として、本発明は、安定な液体製剤中に血漿タンパク質を含む組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質が凝固因子II、VII、IX、X、プロテインC、SおよびZなどのビタミンK依存性血漿タンパク質の酵素前

駆体型または活性型である組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質が非ビタミンK依存性血漿タンパク質である組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質が凝固因子VIII、フォン・ヴィレブランド因子などである組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質を水系液体製剤として提供する組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質を非水系液体製剤として提供する組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質を親水性非水系液体製剤として提供する組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質を水系/非水系混合液体製剤として提供する組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質を体温またはその付近で機能的に安定にする組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質を冷蔵温度またはその付近で機能的に安定にする組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質を前もって水和することなく送達できるようにする組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質を注射によって送達できるようにする組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質をキチンヒドロゲルやキトサンヒドロゲルのような生物起源の生体再吸収性ヒドロゲルによって送達できるようにする組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質を鼻腔内に送達できるようにする組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質を吸入によって送達できるようにする組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その血漿タンパク質を経口的に送達できるようにする組成物を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、血漿タンパク質の先天性または後天性欠乏症を、その欠乏血漿タンパク質の送達によって治療する方法を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その欠乏タンパク質の送達が持続注射または持続注入によってなされる血漿タンパク質欠乏症の治療法を提供する。

もう1つの態様として、本発明は、その欠乏タンパク質の持続的送達が、キトサンヒドロゲルやNOC-キトサンヒドロゲルのような生物起源の生体再吸収性ヒドロゲルからの拡散によってなされる血漿タンパク質欠乏症の治療法を提供する。

上記の総論と下記の詳細な説明は、どちらも単なる例示的説明に過ぎず、請求の範囲に記載される本発明をさらに説明しようとするものであると解釈すべきである。

IV. 図面の簡単な説明

図1. 因子IX安定性のCaCl₂濃度依存性 0~10mMの範囲の様々な濃度のCaCl₂を含む0.01Mヒスチジン、0.1M NaCl(pH6.8)中100単位/mLの因子IX-M試料を、37℃で50日間まで保温し、実施例1の方法に従って因子IX活性をアッセイした。試験した各CaCl₂濃度について半減期(単位:日)を、その濃度に対してプロットした。安定性は、2mM CaCl₂によって急激に上昇し、5mM CaCl₂で最高となり、10mM CaCl₂まで同一水準だった。

図2. 滅菌溶液中の因子IX-M (100単位/mL) の37℃における安定性 実施例3に要約するデータをグラフにしたものである。CaCl₂の添加は、カルシウムを含まない同じ緩衝液と比較して因子IXの安定性を著しく増大させるが、ショ糖を添加しても安定性はそれ以上増大しない。カルシウム/ショ糖製剤にリジンを加えたOctapharma社の処方、因子IXの安定性をリジンなしの処方より有意に減少させる。

図3. 因子IX-M安定性+/-10mM CaCl₂のpH依存性 10mM CaCl₂を含むまたは含まない様々なpHの0.01Mヒスチジン、0.01M NaCl中100単位/mLの因子IX-M試料を、37℃で0~42日間保温し、実施例1の方法に従って因子IX活

性をアッセイした。その半減期（単位：日）をpHに対してプロットした。安定性はいずれのpHについてもカルシウム存在下の方がカルシウム不在下よりもはるかに高かった。各カルシウムレベル内では、中性pHに近いほど安定性が高く、カルシウムの存在下pH6.0～6.8で最大の安定性を示した。

図4. 因子IXは高濃度で保温すると活性化の証拠を示す 0.01Mヒスチジン、0.1M NaCl、10mM CaCl₂ (pH6.8) 中の因子IX-M試料を、10単位(u)/mLから600u/mLまでの様々な因子IX濃度で、37℃で保温した。各濃度について初期活性に対するパーセントを37℃で日数に対してプロットした。10u/mLから100u/mLまでの低い因子IX濃度では、安定性に対する濃度の影響は認められなかった。因子IXの濃度を増大させた場合、活性はいったん増大した後、低下し、その活性ピークは因子IX濃度が高いほど早く現われた。これは、因子IXが高濃度で活性化を示し、活性のスパイク（棘波）を示した後、いったん活性化すると因子IXが安定性を失うので活性が低下することを示している。

図5A, 5B. 高濃度では因子IX-Mの安定性がpH6.0～6.2で最大になる 0.01Mヒスチジン、0.1M NaCl、10mM CaCl₂、pH6.0または6.8中600u/mLの因子IX-M試料を37℃で0～50日間保温し、実施例1の方法に従って因子IX活性をアッセイした。初期活性に対するパーセントと無損傷FIX-Mパーセントを37℃での日数に対してプロットした。pH6.2（図5A）では、無損傷パーセントと活性パーセントがどちらも40～45日の半減期を持った。pH6.8（図5B）では、活性率は15～20日にスパイクを示し、40～45日の半減期で低下するが、無損傷パーセントは14日で0まで低下した。高因子IX濃度では、高い方のpHでこのタンパク質が不安定化し、低い方のpHで安定性が増大する。

図6. 37℃で保温したPPG、グリセロールおよびPMS製剤中の因子IX 実施例4で得たデータをグラフにしたものである。安定性はPPGによって最大となり、その半減期は37℃で14日である。元の物質を水またはグリセロールで復元した場合、得られる半減期はそれぞれ2日および4日短かった。PMSによって得られる安定性は最も低く、その半減期は5.5日だった。

図7. 37℃における因子VIII PPG製剤と因子VIII PEG製剤 実施例5で得

たデータをグラフにしたものである。因子IXと同様に、PPGが因子VIIIに最大の安定性を与える。水で復元すると安定性がいくらか低くなり、PEGでは活性が著しく不安定化する。

図8. 10mM CaCl_2 を伴う 因子IXの37℃における安定性 実施例6で得たデータをグラフにしたものである。試験した3つのpH値での結果をそれぞれプロットすると、凝固活性の半減期は38日から58日まで変動し、pH6.2では活性化を示唆するわずかに二相性の曲線を与えた。安定性はpH6.0~6.2の範囲で最大だった。

図9. 30mM CaCl_2 を伴う 因子IXの37℃における安定性 実施例6で得たデータをグラフにしたものである。試験した3つのpH値での結果をそれぞれプロットすると、pH6.2で活性化の証拠が観察された。安定性はpH5.8~6.2の範囲で最大だった。

図10. 100mM CaCl_2 を伴う 因子IXの37℃における安定性 実施例6で得たデータをグラフにしたものである。試験した3つのpH値での結果をそれぞれプロットすると、pH6.0とpH6.2で40日後に活性化の証拠がわずかに観察された。

安定性はpH5.8で最大だった。

図11. 様々な CaCl_2 濃度を伴う 因子IXのpH5.8温度37℃における安定性 図6で得たデータをグラフにしたものである。

図12. 様々な CaCl_2 濃度を伴う 因子IXのpH6.0温度37℃における安定性 図6で得たデータをグラフにしたものである。100mM CaCl_2 で観察される浅い減衰曲線は、活性化を反映しているのかもしれない。

図13. 様々な CaCl_2 濃度を伴う 因子IXのpH6.2温度37℃における安定性 図6で得たデータをグラフにしたものである。100mM CaCl_2 で観察される浅い減衰曲線は、活性化を反映していると思われ、30mM CaCl_2 では明らかな活性化が観察された。

図14A~14D. SDS-PAGE 実施例6で得たデータを示す。試験したpH/ CaCl_2 の全組合わせに関し、クーマシーブルー染色したSDS-PAGEゲルを、0日と56日について図14Aに、また全ての時点について図14B、14Cおよび14D (還元ゲル)

に示す。

図14A内のレーンは次の通りである：レーン1, 広範囲分子量 (MW) 標品；レーン2, 空；レーン3, 10mM Ca, pH5.8；レーン4, 10mM Ca, pH6.0；レーン5, 10mM Ca, pH6.2；レーン6, 30mM Ca, pH5.8；レーン7, 30mM Ca, pH6.0；レーン8, 30mM Ca, pH6.2；レーン9, 100mM Ca, pH5.8；レーン10, 100mM Ca, pH6.0；レーン11, 100mM Ca, pH6.2。図14B~14D内のレーンは次の通りである：レーン1, 広範囲MW標品；レーン2, 空；レーン3, 第0日；レーン4, 第21日；レーン5, 第28日；レーン6, 第35日；レーン7, 第42日；レーン8, 第49日；レーン9, 第56日；レーン10, 空；レーン11, 広範囲MW標品。

0 時点では、因子IXが全ての製剤で同じに見えた。例外として、100mM CaCl_2 では還元ゲルに高分子量スミアが認められたが、これはおそらく非特異的塩効果によるものだろう。100mM CaCl_2 試料を水で希釈した場合には、高分子量スミアは認められなかった（図14D）。56日目には、全ての試料で断片化が認められ、還元ゲルではそれがとりわけ明白だった。図14Aのレーン3、5および8（pH5.8とpH6.0の10mM CaCl_2 およびpH6.2の30mM CaCl_2 ）では、より多くの断片化が認められる。

図15. 10mM CaCl_2 を伴う因子IXの4℃における安定性 実施例7で得たデータをグラフにしたものである。最初の100%値を越える凝固活性の上昇（これは活性化を示す）が、600単位/mL（70日）、300単位/mL（140日）、200単位/mL（210日）および100単位/mL（410日）で観察される。25単位/mLと50単位/mLでは410日後まで活性化の証拠は観察されない。これらの試料には410日時点で活性の80%以上が残っていた。

図16. 凍結乾燥因子VIIIの非水系液体製剤中37℃における安定性 実施例8で得たデータをグラフにしたものである。

図17. 因子VIIIの安定性はポリプロピレンオリゴマーサイズと相関する PPGオリゴマーサイズ（すなわちそのポリプロピレングリコールを構成するモノマー単位の数）に対してプロットすると、観察される半減期は、PPG1000（これは平均17個のモノマー単位を含有する）までオリゴマーサイズとほぼ比例する。

図18, 図19. 凍結乾燥因子IXの非水系液体製剤中37℃における安定性 実施例

9で得たデータをグラフにしたものである。図18は水、トリプロピレングリコールおよび種々のポリエチレングリコールで得られたデータを示す。図19は種々のポリプロピレングリコールで得られたデータを示す。

図20. アローモデル3000移植用ポンプを用いた因子VIII (AHF-M) の試験管内放出 実施例10で得たデータをグラフにしたものである。このグラフからわかるように、因子VIII活性は第6日までにその95%が失われた。しかしその原因は、AHF-M溶液をポンプに充填する工程中に滅菌性が損なわれたときの細菌の混入によるものであることがわかった（細菌の混入は寒天平板コロニーおよび培養評価によって確認した）。

図21. アローモデル3000移植用ポンプを用いた37℃における因子IXの試験管内放出 実施例10で得たデータをグラフにしたものである。このグラフからわかるように、ポンプからの流出液中の因子IX活性は、13日間の稼動中、比較的一定して減少した。半減期は18~20日で、ポリプロピレン管中で観察された半減期の約半分だった。13日目に、流出する活性は出発活性の60%だった。因子IX流出液中に細菌は検出されなかった。

図22. アローモデル3000移植用ポンプを用いて試験管内に送達される因子IX-Mの単位数 実施例10で得たデータをグラフにしたものである。流出量は正確に2mL/日に維持された。送達される因子IXの一日あたりの単位数は最初の5日間は185~210単位で、第6~11日の間は160~170単位に減少し、最後の2日間はさらに110~140単位に減少した。

図23. アローモデル3000移植用ポンプ中37℃におけるAHF-Mの安定性 実施例11で得たデータをグラフにしたものである。ポンプから流出させた因子VIII試料の活性と、静止状態のポンプ貯蔵槽から採取した因子VIII試料の活性は、有意に相違しなかった（ポンプ流出液の第1試料が示す急落は、ポンプの管系をパージするのに使用した食塩水溶液で流出液が希釈されたためである）。この結果は、ガラス表面とゴム表面が、ポンプを出た因子VIIIの活性を変化させないことを示唆している。

図24. ポリプレピレン管中と比較したアローモデル3000移植用ポンプ中37℃に

におけるAHF-Mの安定性 実施例11で得たデータをグラフにしたものである。静止状態のチタン製ポンプ貯蔵槽から採取した因子VIIIに関する減衰曲線を、以前の試験でポリプロピレン管中で保温した因子VIIIに関する減衰曲線と比較したところ、減衰はポリプロピレン管中よりポンプ中の方が速かった。因子VIIIをアローモデル3000ポンプのチタン製貯蔵槽中37℃で保温した時に観察される安定性が、因子VIIIをポリプロピレン管中37℃で保温した時に観察される安定性より低いということは、これら2つの材質の因子VIIIとの生物適合性に相違があることを示唆している。

図25. アローモデル3000移植用ポンプ中37℃における因子IX-Mの安定性 実施例12で得たデータをグラフにしたものである。ポンプから流出させた因子IX試料の活性と、静止状態のポンプ貯蔵槽から採取した因子IX試料の活性は、有意に相違しなかった。因子VIIIの場合と同様に、ポンプ貯蔵槽内に静置された因子IXとガラス/シリコーンゴム排出カテテルを通して排出された因子IXの間には相違が認められず、ガラスとシリコーンゴムがポンプから出た因子IXの効力を変化させないことが示された。

図26. ポリプロピレン管中と比較したアローモデル3000移植用ポンプ中37℃におけるヒスチジン/NaCl/CaCl₂溶液中の因子XI-M 実施例12で得たデータをグラフにしたものである。静止状態のチタン製ポンプ貯蔵槽から採取した因子IXに関する減衰曲線を、以前の試験でポリプロピレン管中で保温した因子IXに関する減衰曲線と比較したところ、ポリプロピレン管中での半減期が約35日であったのに対し、チタン製貯蔵槽内での生体外半減期は約25日だった。チタン製貯蔵槽内での因子IXの半減期が短いのは、第1アッセイ時点（第2日）における因子IX活性の初期低下（約25%）によるものと思われ、このことは、因子IXの一部がポンプ貯蔵槽の内表面に結合するものの、残りの部分は影響を受けないことを示唆している。

V. 好ましい態様の詳細な説明

A. 定義

特に断わらない限り、本明細書で使用するすべての技術用語と科学用語は、本

発明が属する技術分野の技術者が一般に理解する意味と同じ意味を持つ。本明細書で言及する特許と刊行物はすべて参考文献として本明細書の一部を構成する。

本明細書において「血漿」とは、凝固前に認められるようなヒトまたは動物の血液の液体非細胞成分を指す。これは凝固後に得られる血清とは区別される。

本明細書において「血漿タンパク質」とは、正常なヒトまたは動物の血漿中に認められる可溶性タンパク質を指す。これらは凝固タンパク質、抗体、アルブミン、リポタンパク質、補体タンパク質などを包含するが、これらに限るわけではない。

本明細書において「ビタミンK依存性血漿タンパク質」とは、正常な個人または動物の血漿中に認められるタンパク質であって、凝血原または抗凝血因子として凝固カスケードの一部を構成し、その合成にビタミンKの存在が必要なものを指す。これらは酵素前駆体型または活性型として存在する。ビタミンK依存性血漿タンパク質には、因子II、因子VII、因子IX、因子X、プロテインC、プロテインS、およびプロテインZが含まれる。

本明細書において「非ビタミンK依存性血漿タンパク質」とは、正常な個人または動物の血漿中に認められるタンパク質であって、凝血原、抗凝固因子または補因子として凝固カスケードの一部を構成し、その合成にビタミンKの存在が必要でないものを指す。これらは酵素前駆体型、非活性補因子型または活性型として存在する。非ビタミンK依存性血漿タンパク質には因子VIIIとフォン・ヴィレブランド因子が含まれる。

本明細書において「因子IX」（または「凝固因子IX」）とは、内因系凝固経路の一構成要素で、血液凝固に必須な血漿糖タンパク質を指す。生理活性因子IXの先天性X連鎖欠乏症は、生命にかかわる可能性のある疾患、血友病Bをもたらす。

本明細書において「因子VIII」（または「凝固因子VIII」）とは、内因系凝固経路の一構成要素で、血液凝固に必須な血漿糖タンパク質を指す。生理活性因子IXの先天性X連鎖欠乏症は、生命にかかわる可能性のある疾患、血友病Aをもたらす。

本明細書において「液体製剤」とは、そこに含まれる構成分子が自由運動しつつも分離する傾向がないことを特徴とする、液体として認められる組成物を指す。液体製剤には、水系液体と非水系液体が含まれる。

本明細書において「水系液体製剤」とは、水を一成分として含有する液体組成物を指す。

本明細書において「非水系液体製剤」とは、水を一成分として含まない液体組成物を指す。

本明細書において「親水性非水系液体製剤」とは、水を一成分として含まず、しかも、水に対して強い親和性を持つ液体を含有する液体組成物を指す。

本明細書において「水系/非水系混合液体製剤」とは、水ともう1つの液体組成物の混合物を含有する液体組成物を指す。

本明細書において「体温」とは、ヒトまたは動物の正常時の生理学的温度を指す。ヒトの平均体温は摂氏37度(37℃)である。

本明細書において「冷蔵温度」とは、凍結が不可能な冷蔵温度を指す。摂氏4度(4℃)は冷蔵温度の一つである。

本明細書において「復元」とは、液体の添加により固体物質を液体の溶液または懸濁液に溶解または再懸濁することを指す。

本明細書において「再水和」とは、水の添加による液体状態への復元を指す。

本明細書において「予防」とは、症状の発生を防止する処置の適用を指す。

本明細書において「持続的送達」とは、ヒトまたは動物の体内に物質を連続的に導入することを指す。

本明細書において「注射」とは、ヒトまたは動物の体内に液体を力で押し込むことを指す。

本明細書において「ヒドロゲル」とは、相当部分が水からなり、その中にポリマーまたはその混合物が溶解または分散している半固形組成物を指す。

本明細書において「鼻腔内送達」とは、鼻腔および副鼻腔の粘膜を通した吸収によってヒトまたは動物の体内に物質を導入することを指す。

本明細書において「吸入送達」とは、胚を通した吸収によってヒトまたは動物

の体内に物質を導入することを指す。

本明細書において「経口送達」とは、口を通した摂取によってヒトまたは動物の体内に物質を導入することを指す。

本明細書において「非経口送達」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内注射ならびに注入を含む投与法を指す。

本明細書において「安定性」とは、ある物質の活性および/または機能を決定する特徴の保持を指す。

本明細書において「医薬的に許容できる担体」とは、無毒性の固体、半固体または液体賦形剤、希釈剤、封入材料または任意のタイプの製剤補助剤を指す。

本明細書において「患者」とは、医療および/または処置を受けるヒトまたは動物の個体を指す。

本明細書において「先天性欠乏症」とは、正常な個体中に認められる化合物を遺伝の結果として欠く個体の状態を指す。先天性欠乏症は、現時点では保証された治療法でない移植術や遺伝子的介入を行わなければ、いつまでも続く。

本明細書において「後天性欠乏症」とは、正常な個体中に認められる化合物を先天的でない作用の結果として欠く個体の状態を指す。後天性欠乏症は他の状態またはそれらの処置の一時的結果である場合も多いが、それでもなお消耗性であり、生命を脅かす。

B. 好ましい態様

本発明の第1の好ましい態様は、1種またはそれ以上の血漿タンパク質を含有する安定な液体製剤に向けられる。本発明の安定液体製剤は安定であること、すなわちその製剤に含まれる血漿タンパク質の活性の少なくとも50%は、37℃で少なくとも1日（24時間）、より好ましくは少なくとも13日間、最も好ましくは少なくとも30日間維持され、もしくは4℃で少なくとも540日間維持されることが好ましい。血漿タンパク質の活性は、当業者に知られる方法および技術のいずれかで測定してもよい。

本発明のこの態様によれば、どの血漿タンパク質がその安定液体製剤に含まれていてもよい。これらの血漿タンパク質は、まだ活性化されていない酵素前駆体

または補因子の形態にあってもよいし、あるいは活性型であってもよい。好適な血漿タンパク質は、ヒトまたは哺乳動物の血漿から当業者に知られ当業者が利用できる精製法によって、または一般的な組換えDNA技術に従って導入されたヒトまたは哺乳動物の血漿タンパク質を発現させる遺伝子を含有する組換え組織培養、ウイルス、酵母、細菌などの上清またはペーストから、または一般的なトランスジェニック技術に従って導入されたヒト血漿タンパク質を発現させる遺伝子を含有するトランスジェニック動物の体液（例えば血液、乳、リンパ液、尿など）から得ることができる。本発明液体製剤は、所望に応じてさらに1種またはそれ以上の追加タンパク質を含有してもよく、その追加タンパク質としては、他の血漿タンパク質、トロンビン阻害剤のようなプロテアーゼ阻害剤、担体タンパク質（フォン・ヴィレブランド因子を含むが、これに限らない）、ペプチド、およびそれらの誘導体が挙げられる。

特に好ましい本発明の態様では、その血漿タンパク質がビタミンK依存性血漿タンパク質である。そのようなビタミンK依存性血漿タンパク質の具体例には、因子II、因子VII、因子IX、因子X、プロテインC、プロテインSおよびプロテインZがあるが、これらに限るわけではない。そのビタミンK依存性血漿タンパク質は、因子IXであることが好ましい。

本発明の特に好ましいもう1つの態様では、その血漿タンパク質が非ビタミンK依存性血漿タンパク質である。非ビタミンK依存性血漿タンパク質には、因子VIIIとフォン・ヴィレブランド因子が含まれるが、これらに限らない。その非ビタミン依存性血漿タンパク質は因子VIIIであることが好ましい。

本発明の特に好ましいさらなる態様では、その液体製剤が水系液体製剤である。その水系液体製剤は、その製剤のpHが予定したレベル、例えば5.8~6.8の範囲に維持されるように、1種またはそれ以上のpH緩衝化合物を含有することが好ましい。本水系液体製剤に使用されるpH緩衝化合物は、アミノ酸またはアミノ酸の混合物であることが好ましく、そのpH緩衝化合物がヒスチジンまたはヒスチジンと他のアミノ酸との混合物であれば、より好ましい。

あるいは、上記pH緩衝化合物が製剤のpHを予定のレベル、例えば5.8~6.8の範

囲に維持し、かつ、カルシウムイオンをキレートしない薬剤であることも好ましい。そのようなpH緩衝化合物の具体例としては、イミダゾールと酢酸イオンが挙げられるが、これらに限るわけではない。

pH緩衝化合物は、本水系液体薬剤のpHを予定のレベルに維持するのに適した任意の量で存在できる。pH緩衝化合物がアミノ酸である場合は、そのアミノ酸の濃度が0.1ミリモル/リットル (0.1mM) ~1000mM (1M) であることが好ましい。また、このアミノ酸の濃度は5mM~100mMであることがより好ましく、10mM~50mMが最も好ましい。

pH緩衝化合物は、本水系薬剤のpHを少なくとも4.0のレベルに維持することが好ましい。血漿タンパク質が因子IXである場合は、pH緩衝化合物がpHを5.5から8.0までのレベルに維持することがより好ましく、それが5.5から6.8までのレベルであればさらに好ましく、5.8から6.2までのレベルであれば最も好ましい。

また本発明水系液体薬剤が、1種またはそれ以上の浸透性調節剤、すなわちその薬剤の浸透性（例えば張性、オスモル濃度および/または膨張圧）を、受容する個体の血流および血球に合ったレベルに調節する化合物を含有することも好ましい。この浸透性調節剤はカルシウムイオンをキレートしないことが好ましい。

この浸透性調節剤は、本薬剤の浸透性を調節する化合物であれば、当業者に知られ当業者が利用できるいずれの化合物であってもよい。当業者は、ある与えられた浸透性調節剤が本発明薬剤での使用に適しているかどうかを実験的に決定することができる。好適なタイプの浸透性調節剤の具体例としては、塩化ナトリウムや酢酸ナトリウムなどの塩、ショ糖やマンニトールなどの糖類、グリシンなどのアミノ酸、これらの薬剤および/またはこれら薬剤タイプの1またはそれ以上の混合物が挙げられるが、これらに限るわけではない。

浸透性調節剤は、その薬剤の浸透性を調節するに足る任意の濃度で存在できる。浸透性調節剤は本発明薬剤のオスモル濃度を50~1000ミリオスモル/L (mOsm/L) に調節できる量で存在することが好ましく、それが100~

500mOsm/Lであればより好ましく、150~350mOsm/Lであれば最も好ましい。

塩または塩の組み合わせを浸透性調節剤として使用する場合は、その総濃度が

1mM~1Mであることが好ましく、25mM~500mMであればさらに好ましく、50mM~150mMが最も好ましい。

本水系液体製剤は、さらにカルシウムイオンのような多価金属イオンの発生源を含有することが好ましい。本発明形態製剤の安定化に役立ち、受容する個体に有害な影響を与えないものであれば、いずれの多価金属イオンも使用できる。好適な金属イオンは、これら2つの基準に基づいて当業者が実験的に決定できる。また、そのような金属イオンの好適な発生源は知られていて、無機塩や有機塩がそれに含まれる。

本水系液体製剤はカルシウムイオン、マグネシウムイオンおよび/またはマンガニイオンのような二価金属イオンの発生源を含有することが好ましい。より好ましくは、本水系液体製剤は塩化カルシウムのようなカルシウムイオンの発生源を含有する。

本水系液体製剤中のカルシウムイオンのような二価金属イオンの濃度は、0.1mM~1Mであることが好ましく、より好ましくは2mM~200mM、最も好ましくは10mM~100mMである。

本発明水系液体製剤の好ましい態様では、その血漿タンパク質が因子IX、pH緩衝化合物がアミノ酸であるヒスチジン、浸透性調節剤が塩化ナトリウムであり、カルシウムイオンの発生源が塩化カルシウムである。ヒスチジンの濃度は約10mM、NaClの濃度は約100mMであることが好ましく、カルシウムイオンの濃度はその製剤のpHによって変動する。水系製剤のpHが約6.2である場合は塩化カルシウム濃度が約10mMであることが好ましく、pHが約6.0である場合はCaCl₂濃度が10mMと30mMの間にあることが好ましく、pHが約5.8である場合はCaCl₂濃度が10mMと100mMの間にあることが好ましい。

本発明の特に好ましいもう1つの態様では、その液体製剤が非水系液体製剤である。本発明のこの態様では、それがその製剤に含まれる血漿タンパク質に安定性を与えるものである限り、好適な非水系液体のいずれを使用してもよい。この

非水系液体は親水性液体であることが好ましい。好適な非水系液体の具体例としては、グリセロール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ポリジメチルシロキサン

(PMS)、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリエチレングリコール ("PEG") 200、PEG300あるいはPEG400のようなエチレングリコール類、ジプロピレングリコール、トリプロピレングリコール、ポリプロピレングリコール ("PPG") 425、PPG725、PPG1000、PPG2000、PPG3000あるいはPPG4000のようなプロピレングリコール類が挙げられる。

好ましくは、非水系液体製剤への混和に先立って血漿タンパク質を凍結乾燥する。その血漿タンパク質は凍結乾燥因子VIIIまたは凍結乾燥因子IXであることがより好ましい。

本発明非水系液体製剤の極めて好ましい態様では、その血漿タンパク質が因子IXであり、非水系液体がPEG200のようなエチレングリコールであるか、トリプロピレングリコール、PPG425、PPG725、PPG1000あるいはPPG2000などのプロピレングリコールである。本発明非水系液体製剤の極めて好ましいもう1つの態様では、その血漿タンパク質が因子VIIIであり、非水系液体がPPG425、PPG725またはPPG1000などのプロピレングリコールである。

本発明の特に好ましいもう1つの態様では、その液体製剤が水系/非水系混合液体製剤である。本発明のこの態様では、その水系/非水系液体製剤がそこに含まれる血漿タンパク質に安定性を与える限り、上述のような任意の好適な非水系液体液体製剤を上述のような任意の水系液体製剤と共に使用できる。このような製剤中の非水系液体は親水性液体であることが好ましい。好適な非水系液体の具体例としては、グリセロール、DMSO、PMS、あるいはPEG200、PEG300またはPEG400のようなエチレングリコール類、あるいはPPG425、PPG725、PPG1000、PPG2000、PPG3000またはPPG4000のようなプロピレングリコール類が挙げられる。

本発明の安定液体製剤によれば、1種またはそれ以上の血漿タンパク質を凍結状態または非凍結液体状態で貯蔵することができる。本安定液体製剤は少なくとも -170°C の温度で保存されることが好ましく、より好ましくは少なくとも 0°C 、

さらに好ましくは 0.1°C から 42°C までの温度、最も好ましく 4°C から 37°C までの温度で保存される。

本発明の安定液体製剤は、非凍結状態で少なくとも24時間の間、その血漿タン

パク質の活性の少なくとも50%を維持する。好ましくは、活性の少なくとも50%が少なくとも2日間保たれ、より好ましくは少なくとも30日間、さらに好ましくは少なくとも180日間、さらに好ましくは少なくとも540日間、最も好ましくは少なくとも3年間保たれる。

個体内の1種またはそれ以上の血漿タンパク質の標準レベルまたは正常レベルが低下することによって起こる血友病のような状態が（血友病A治療用の）因子VIIIや（血友病B治療用の）因子IXのような1種またはそれ以上の血漿タンパク質を投与することによって治療できることは理解されるだろう。したがって、本発明の第2の好ましい態様は、1種またはそれ以上の血漿タンパク質が欠乏している患者の治療法であって、本発明の安定液体製剤をその患者に投与することからなる方法に向けられる。

持続投与は、当業者に知られている任意の方法および技術に従って行なうことができ、そのような方法には、アローモデル3000 (Arrow International社, マサチューセッツ州ウォルポール) やミニメッド2001 (MiniMed Technologies社, カリフォルニア州シルマー) のような外科的に移植できるポンプを用いる持続注射または持続注入; ミニメッド504S (MiniMed Technologies社) やH-トロンV100 (H-Tron V100; Disetronic Medical Systems社, ミネソタ州ミネトンカ) のような体外装着型ポンプを用いる注射または注入; キトサンヒドロゲルやN,O-カルボキシメチルキトサン (NOC-キトサン) ヒドロゲルのような生物起源の生体再吸収性ヒドロゲル単体からの拡散、もしくはそれらヒドロゲルをヒドロゲルの多孔性および/またはヒドロゲルの安定性および/またはタンパク質放出の速度を調節するポリリジンやポリプロピレングリコールなどの荷電または非荷電ポリマー剤と組み合わせたものからの拡散; あるいは、ポリプロピレングリコールのような合成生体再吸収性ヒドロゲル単体からの拡散、またはそれらヒドロゲルをヒドロゲルの多孔性および/またはヒドロゲルの安定性および/またはタンパク質

放出の速度を調節するポリリジンのような荷電または非荷電ポリマー剤と組み合わせたものからの拡散がある。

持続投与用の血漿タンパク質は、個々の患者の臨床状態、その組成物の送達部

位、投与方法、投与スケジュールと、従事者が知るその他の要素を考慮して、適切な医療行為となるような方法で、製剤化し、投与することが好ましい。本発明の目的に関して血漿タンパク質の「有効量」は上述のような考慮をして、そのように決定される。

非経口的に投与される血漿タンパク質の総医薬有効量は、好ましくは、血漿タンパク質を約1単位/mLから約2000単位/mLまでの濃度で提供することができる量になるだろう。この投与量は、約50単位/mLから約1500単位/mLまでの濃度を与えるに足る量であることがより好ましく、それが約100単位/mLから約1000単位/mLであればさらに好ましくは、約600単位/mLが最も好ましい。適切な投与量を選択する際の要因は、それによって得られる結果（例えば循環系内の血漿タンパク質レベルの増大によって測定されるような結果）である。変化を観察するのに必要な処置の長さと、応答が起こるのに必要な処置後の期間は、所望する効果と治療される個体によって変動するだろう。

一般的な提案として、本発明にしたがって調剤される血漿タンパク質の純度は、好ましくは、そのタンパク質に最適な安定性をもたらすことが通常の当業者に知られているような適当な純度だろう。例えば、その血漿タンパク質が因子IXである場合、その因子IXは超高純度であることが好ましい。その血漿タンパク質は、その血漿タンパク質が製造、貯蔵および/または使用中に断片化、活性化及および/または分解する原因となる物質を除去するために、複数のクロマトグラフィー精製段階（例えばアフィニティークロマトグラフィーや、好ましくは免疫アフィニティークロマトグラフィーなど）にかけられていることが好ましい。精製によって除去することが好ましいそのような物質の具体例には、トロンビンと因子IXa；インター α トリプシンインヒビターやプレアルファトリプシンインヒビターのようなその他のタンパク質夾雑物；脂質のような非タンパク質夾雑物；リポタンパク質のようなタンパク質夾雑物と非タンパク質夾雑物の混合物がある。

本発明の製剤に使用される血漿タンパク質の濃度は、当業者が実験的に決定したときにその血漿タンパク質の安定性が最大となるように選択することが好ましい。例えば、その血漿タンパク質が因子IXである場合、本発明製剤中の因子IXの

安定性は低濃度で最大となり、因子IX濃度が増大するにつれて減少する傾向がある。例えば、本発明製剤の一態様（0.01Mヒスチジン、0.10M塩化ナトリウム、0.01M塩化カルシウム、pH6.8）では、約100単位/mL（0.4mg/mL）未満の因子IX濃度において、ARCが調製した因子IX免疫アフィニティー精製品は、37℃で56日間保温しても、因子IXaへの活性化の証拠を示さなかった。しかし、より高い因子IX濃度（200～600単位/mL）では、同じ因子IX免疫アフィニティー精製品を37℃で保温した時に、活性化の証拠が認められ、その活性化の程度はタンパク質濃度が増大するにつれて増加した（図4）。本発明製剤のより酸性な態様（例えばpH5.8～6.2）で、600単位/mL（2.4mg/mL）の同じ因子IX免疫アフィニティー精製品を保温したところ、その活性化はあったとしてもはるかに低かった（図5および図8～14）。

本発明の好ましい態様では、1種またはそれ以上の血漿タンパク質が医薬的に許容できる担体に含有される。この担体は、等張性と化学的安定性を増進させる物質などの添加剤を少量含有することが好ましい。これらの物質は使用する投与量と濃度で受容者にとって無毒性であり、これらには次に挙げるものが含まれる：リン酸、クエン酸、コハク酸、酢酸、乳酸、酒石酸、その他の有機酸またはそれらの塩のような緩衝剤；トリスヒドロキシメチルアミノメタン（TRIS）、重炭酸塩、炭酸塩、その他の有機塩基およびそれらの塩；アスコルビン酸などの抗酸化剤；低分子量（例えば約10残基未満の）ポリペプチド、例えばポリアルギニン、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸など；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリンなど；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン（PVP）、ポリプロピレングリコール（PPG）、ポリエチレングリコール（PEG）など；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、リジン、またはアルギニンなど；セルロースまたはその誘導体、グルコース、マンノース、ショ糖、デキストリン、あるいはヘパリ

ン、硫酸コンドロイチン、硫酸デキストランのような硫酸炭水化物誘導体を含む単糖類、二糖類、その他の炭水化物；多価金属イオン、例えばカルシウムイオン、マグネシウムイオン、マンガンイオンを含む二価金属イオンなど；EDTAのよう

なキレート剤；マンニトールやソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムやアンモニウムのような対イオン；および/またはポリソルベートやポロキサマーのような非イオン界面活性剤。

このような組成物は、経口投与、直腸内投与、非経口投与、皮下投与、大槽内投与、腔内投与、腹腔内投与、局所投与（散剤、軟膏、滴剤または経皮吸収パッチなどによる）、頬腔内投与することができ、また経口スプレーまたは鼻スプレーとして肺に投与したり、吸入剤として投与できる。医薬的に許容できる担体は、キチンヒドロゲルやキトサンヒドロゲルのような生物起源の生体再吸収性ヒドロゲルであることが好ましい。

1種またはそれ以上の血漿タンパク質を徐放系によって投与するのによいだろう。徐放性組成物の好適例としては、フィルムやマイクロカプセルのような成型品の形態にある半透過性ポリマー基盤が挙げられる。徐放性基盤には、ポリ乳酸（米国特許第3,773,919号；欧州特許第58,481号）、L-グルタミン酸と γ -エチル-L-グルタメート（U.Sidmanら, Biopolymers 22:547-556(1983)）またはポリ（メタクリル酸2-ヒドロキシエチル）またはエチレンビニルアセテート（R.Langerら, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277(1981); R.Langer, Chem. Tech. 12:98-105(1982)）のコポリマー、あるいはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133,988号）などがあるが、これらに限るわけではない。徐放性血漿タンパク質組成物には、リポソームに封入した血漿タンパク質も含まれる。1種またはそれ以上の血漿タンパク質を含有するリポソームは、当業者に知られている方法、例えばDE 3,218,121; Epsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:3688-3692(1985); Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4030-4034(1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 特願昭58-118008; 米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号; EP 102,324に記述されているような方法のいずれで調製してもよい。リポソームは通常、小さい（約200~800

オングストローム）単層型であり、その脂質含量は約30モル%コレステロール以上で、その比率はその治療法が最適となるように選択される。

治療的投与に使用される1種またはそれ以上の血漿タンパク質を含有する組成

物は滅菌状態でなければならない。滅菌性は滅菌ろ過膜（例えば0.2ミクロン膜）を通してろ過するか、 γ 線照射によって、あるいは当業者に知られているその他の適当な手段によって容易に達成することができる。治療用ポリペプチド組成物は一般的には、例えば滅菌アクセス口を持つ容器や、皮下注射針で突き刺せる栓を持つ静脈内溶液バッグまたはバイアルに入れられる。

これらの組成物は通常、単位用量容器または多用量容器、例えば密閉したアンブルやバイアルに、水溶液として、あるいは復元用の凍結乾燥製剤として保存されるだろう。凍結乾燥製剤の一例として、10mLバイアルに滅菌ろ過した1% (w/v) 血漿タンパク質水溶液（例えば因子IXまたは因子VIIIの水溶液）5mLを充填し、得られた混合物を凍結乾燥する。注入溶液は、その凍結乾燥物質を滅菌注射水（WFI）で復元することによって調製される。

さらに本発明は、本発明医薬組成物の1またはそれ以上の成分で満たされた1またはそれ以上の容器を含む医薬パックまたはキットをも提供する。そのような容器には、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形式で、ヒト投与に関する製造、使用または販売の該機関による認可を反映する情報を付すことができる。さらに、本発明の組成物を他の治療用化合物と組み合わせて使用してもよい。

本発明の好ましい態様は、安定な液体中の血漿タンパク質を、キットの一部として提供する。より好ましい態様は、安定な液体中の血漿タンパク質を、注射によってその血漿タンパク質を送達するためのキットとして提供する。より好ましいもう1つの態様は、安定な液体中の血漿タンパク質を、注射器および/または針による注射用のキットとして提供し、そのキットには注射器および/または針が含まれるが、それらに限るわけではない。より好ましいもう1つの態様は、安定な液体中の血漿タンパク質を、静脈内、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内または鼻腔内送達用の持続注射または持続注入システムの貯蔵槽にその液体を注入するための

キットとして提供する。

さらに好ましいもう1つの態様は、安定な液体中の血漿タンパク質を、その液

体をヒドロゲル内に組み込んだ後、その血漿タンパク質含有ヒドロゲルを皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、腹腔内注射などの注射によって、あるいは皮膚表面、粘膜などを通した頬腔吸収、経皮、鼻腔内局所投与によって、あるいは吸入によって鼻および/または肺に導入するためのキットとして提供する。より好ましいもう1つの態様は、注射または移植（皮下、経皮、筋肉内、腹腔内注射などの注射を含むが、これらに限らない）用の微小球またはヒドロゲルに入った安定な液体中の血漿タンパク質を送達するためのものである。

本発明のこれら様々な態様は、従来使用されてきた組成物および方法より有利な点をいくつか持っている。

第1の利点は、本発明の血漿タンパク質製剤が、現場で調製しなくても、そのまま使用できることである。これにより、そのタンパク質は、再水和が必要な凍結乾燥製剤よりも速やかに送達できる。

第2の利点は、本発明が溶液状態の血漿タンパク質の安定性を増大させるということである。本発明の製剤によれば、溶液状態の当該タンパク質を、従来使用されてきた製剤を再水和した場合に可能な期間よりも長く、ある与えられた活性レベルで貯蔵することができる。この安定性は冷蔵下および体温での貯蔵時に向上する。体温で安定であることから、持続注射または持続注入送達システム内の、皮下または体表面の貯蔵槽中に、その血漿タンパク質を保持しておくことができる。またこれは、本発明の組成物を注射または注入前にヒドロゲルに組み入れ、その添加物を含むヒドロゲルからの拡散によって送達することを可能にする。

本発明の第3の利点は、余分な経費をかけたり冷蔵（冷凍）の制約を伴うことなく、その血漿タンパク質を保存できるということである。本発明は、一例として、因子IXが冷蔵下4℃で活性を失うことなく1年以上にわたる長期間保存できることを立証すると共に、体温37℃で1ヶ月以上保存できることをも立証する。冷蔵が不可能な状況の場合、本発明によれば、予防用または緊急用として、調製済注射用血漿タンパク質を室温で保存しておくことができる。

第4の利点は、先天性または後天性血漿タンパク質欠乏症を、正常血漿中に認

められるレベルにより近く、かつ、正常な止血が達成されるレベルの血漿タンパク質を持続的に与えるような形で、予防的に処置できるということである。患者をいつまでも衰弱させる累進的累積的回復不可能な組織損傷を防止するのは、絶え間ない正常な止血状態である。出血エピソードとその結果起こる損傷の危険を排除することにより、患者とその家族にとって人生の質が向上し、若い患者は小さな子供にとって通常の活動により完全に参加することが可能になり、また年配の患者は仕事を続け、社会に貢献することができる。

下記の実施例は単なる例示であって、添付の請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定しようとするものではない。本発明の方法に本発明の思想と範囲から逸脱することなく様々な変更や改良を加えうることは、当業者には明らかだろう。したがって本発明は、それらが添付の請求項とそれに相当するものの範囲に含まれる限り、本発明を変更または改良したものをも包含するものとする。

本明細書で言及する特許と刊行物はすべて明白に、参考文献として本明細書の一部を構成する。

VI. 実施例

A. 材料

凝固因子IX熱処理品 (CFIX-HT) : プールヒト血漿から、陰イオン交換クロマトグラフィーでビタミンK依存性凝固因子を捕捉した後、硫酸デキストランクロマトグラフィーでそれらの因子を分離し、凍結乾燥し、ウイルス感染力を減少させるために乾熱処理することによって調製した中純度因子IX濃縮物。

Baxter/Hyland社 (カリフォルニア州グレンデール) がARCのために製造したもの。製品は10~20% 因子IXと、極めて少量の因子IIおよびXからなる。そのタンパク質の大部分 (70~80%) は、インター α トリプシンインヒビター (IaI) である。

凝固因子IX溶媒/洗剤処理品 (CFIX-SD) : CFIX-HTと同じクロマトグラフィー段階 (ただし、最後のクロマトグラフィー段階に先立って、ウイルスを失活させるためにリン酸トリ-n-ブチル (TNBP) とトリトンX-100で処理した) を行

うことによって調製した中純度因子IX濃縮物。その他の点はCFIX-HTと同様。

因子IX-M (Hyland) : カリフォルニア州グレンデールのBaxter/Hyland社におけるパイロットスケール生産にて、プールヒト血漿から調製された超高純度濃縮物。その生産には、陰イオン交換クロマトグラフィー、溶媒/洗剤処理、固定化金属イオン依存性抗ヒト因子IXモノクローナル抗体 (抗FIX-Mab) の7.5リットルカラムでの免疫アフィニティークロマトグラフィー、および最終的な陰イオン交換仕上げ段階を使用する。

因子IX-M (JHL) : メリーランド州ロックヴィルのARCジェローム・ホランド研究所 (ARC Jerome Holland Laboratory) で調製された超高純度濃縮。CFIX-SDを復元し、40mM $MgCl_2$ の存在下に抗FIX Mab樹脂1リットルにのせ、1M NaCl/110mM $MgCl_2$ で洗浄し、クエン酸/NaCl緩衝液で溶出した。、"DEAE後"と呼ぶ調製物は、マウスIgGとその他の夾雑物のレベルを下げるためにさらに陰イオン交換カラムで精製した。比活性とSDS-PAGEは、FIX-M調製品の純度がいずれも95%かそれ以上であったことを示す。

アルファナイン (ARC/A9) : Alpha Pharmaceuticals社が、彼らの特許精製法に従って、プールヒトARC血漿から得たDEAE溶出液をクエン酸バリウム吸着、溶媒/洗剤処理、および硫酸デキストランアガロースでの2段階のアフィニティークロマトグラフィーにかけることによってARCのために調製したもので、Alpha社の特許製剤中凍結乾燥体として提供された高純度因子IX濃縮物。安定性試験のためにARC製剤中に透析したもの。

モノニン (ARC/M9) : この高純度因子IX濃縮物は、固定化した抗因子IXモノクローナル抗体上での免疫アフィニティークロマトグラフィーと、その後のヘキシルアミンアガロースでのクロマトグラフィーを含む方法によって、Armour Pharmaceuticals社が製造した。

B. 実施例1: 緩衝液、二価カチオンおよびその他の賦形剤が凝固因子IXの安定性に与える影響

CFIX-M (JHL) /DEAEを0.01Mヒスチジン, 0.1M NaCl, pH6.8(ヒスチジン-食塩水) に透析するか、0.02Mクエン酸ナトリウム (NaCit) , 0.11 NaCl, pH6.8

(クエン酸-食塩水) 中に放置した。その溶液の一部を、等容量の2×添加剤 (適

当な緩衝液（ヒスチジン-食塩水またはクエン酸-食塩水）中に所望の最終濃度の2倍で調製したものと混合した。調剤した溶液を滅菌ろ過し、滅菌チューブに無菌的に分注し、37℃または4℃で指定した期間保温し、この試験が終わるまで凍結し、最後に各試料を溶解し、アッセイした。

因子IX凝固アッセイは、コンタクト (Kontakt) ブランドAPTT (Pacific Haemostasis社) と先天性因子IX欠乏血漿 (George KingまたはUniversal Reagents社) を用いる一段階法で行なった。標品は凍結乾燥CFIX-SD濃縮物とした。因子IXの作業希釈液は、タンパク質が表面で損失および変性するのを防ぐために0.1M NaCl、0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) および0.01% トゥイーン20を含有する0.05Mイミダゾール緩衝液(pH7.3)中に調製した。各試料をMLAエレクトラ900自動凝固時間計 (Electra 900 Automatic Coagulation Timer) でアッセイした。どの実験にも、2つまたはそれ以上の検量線を含めた。

試験管内半減期 ($T_{1/2}$)、すなわち因子IX凝固活性が元の活性の50%まで低下する時間を日数で表わしたものを、初期活性に対する残存%の対数を保温日数に対してプロットした直線片対数プロットから決定した。

結果

各試料の安定性を次の表1に示す。

表 1

pH6.8における因子IX凝固活性 (100単位/ml) の試験管内半減期 ($T_{1/2}$, 日)

番号	製剤	$T_{1/2}$ 37℃	$T_{1/2}$ 4℃
1	0.01M ヒスチジン/0.1M NaCl	12.0	310
2	0.01M ヒスチジン/0.1M NaCl+10mM CaCl ₂	41	540
3	0.01M ヒスチジン/0.1M NaCl+10mM MgCl ₂	10	305
4	0.02MNaCit/0.11M NaCl	10.0	110
5	0.02MNaCit/0.11M NaCl+40mM CaCl ₂	5	300
6	0.01M ヒスチジン/0.1 M NaCl+ヘパリン, 2u/mL	8	—
7	0.01M ヒスチジン/0.1M NaCl+ヘパリン, 2u/mL+10mM CaCl ₂	36	—
8	0.01M ヒスチジン/0.1M NaCl+1mM コリン	9	—

因子IX-M (JHL) DEAE仕上げカラム後

実施例1が示すところは次の通りである。

- (1) ヒスチジンは、特に4℃で、クエン酸より高い安定性を与える（1番と4番の対比）。
- (2) カルシウムをマグネシウムに置き換えることはできない（3番と2番の対比）。
- (3) ヘパリンの存在は因子IXの安定性を向上させない（6番，7番）。

C. 実施例2：種々の賦形剤がヒスチジン-食塩水中の凝固因子IXの安定性を与える影響

クエン酸-食塩水中のCFIX-M (JHL) を0.01Mヒスチジン, 0.1M NaCl, pH6.8 (ヒスチジン-食塩水) で1:10に希釈して、0.009Mヒスチジン、0.002Mクエン酸、0.1M NaCl、pH6.8 (緩衝液A) の最終組成にするか、ヒスチジン緩衝液 (緩衝液B) に対して透析した。その後、試料を上記実施例1と同様に、ただし次の変更を加えて処理した：

- (1) 下記の表に示すように、試料を37℃で保温した。
- (2) 因子IX凝固アッセイをランサーコアギュライザーII(Lancer Coagulyzer II)で行なった。

結果

各試料の安定性を次の表2に示す。

表 2

37℃における因子IX-Mの凝固活性の試験管内半減期 ($T_{1/2}$, 日)

番号	製剤	T _{1/2} (日)
1	0.009M ヒスチジン, 0.002M クエン酸, 0.1M NaCl, pH6.0	2.2
2	0.009M ヒスチジン, 0.002M クエン酸, 0.1M NaCl, pH8.0	4.2
3	0.009M ヒスチジン, 0.002M クエン酸, 0.1M NaCl, pH6.8 (緩衝液 A)	5.0
4	緩衝液 A 中の 0.05M グリシン	2.8
5	緩衝液 A 中の 0.5M グリシン	3.0
6	緩衝液 A 中の 0.1%PEG4000	4.0
7	緩衝液 A 中の 1.0%PEG4000	5.0
8	緩衝液 A 中の 0.1%アルブミン (BSA)	1.3
9	緩衝液 A 中の 1.0%アルブミン (BSA)	1.8
10	緩衝液 A 中の 0.01%トウイーン	3.0
11	緩衝液 A 中の 0.10%トウイーン	5.0
12	0.01M ヒスチジン, 0.1M NaCl, pH6.8 (緩衝液 B)	5.0
13	緩衝液 B 中の 0.1M グリシン, 2.5mM CaCl ₂	28.0
14	緩衝液 B 中の 5mM CaCl ₂	30.0
15	緩衝液 B 中の 100mM CaCl ₂	30.0

因子IX-M (JHL) DEAE仕上げカラム前

この結果からまずわかることは、次の通りである。

- (1) カルシウムが存在しないと因子IXの安定性が抑制されうる。
- (2) 他の被検賦形剤（グリシン、ポリエチレングリコール (PEG)、アルブミンまたはトウイーン）の添加は、カルシウムの不在を補うことができない。
- (3) 因子IXはアルブミンによって不安定化される。

D. 実施例3：pH、純度および賦形剤が凝固因子IXの安定性に及ぼす影響

DEAE仕上げを行なった因子IX-M (JHL)、DEAE仕上げを行っていない因子IX-M (JHL)、CFIX-SD、およびARC製剤中のアルファナイン (ARC/A9) を上記実施例2と同様に処理した。

結果

各試料の安定性を次の表3に示す。

表 3

37℃における因子IXの凝固活性の試験管内半減期 (T_{1/2}, 日)

番号	製剤	pH	FIX	T _{1/2} 37℃
1	0.01M ヒスチジン/0.1M NaCl +10mM CaCl ₂	6.8	DEAE	49
2	0.01M ヒスチジン/0.1M NaCl	6.8	DEAE	12
3	ヒスチジン/NaCl+20%ショ糖 +10mM CaCl ₂	6.8	DEAE	42
4	ヒスチジン/NaCl+0.5M グリシン +20%ショ糖+10mM CaCl ₂	6.8	DEAE	37
5	ヒスチジン/NaCl+10mM CaCl ₂	6.8	CFIX-SD	18*
6	ヒスチジン/NaCl	6.9	CFIX-SD	7
7	ヒスチジン/NaCl+10mM CaCl ₂	6.8	ARC/A9	17
8	ヒスチジン/NaCl	6.9	ARC/A9	2.5
9	ヒスチジン/NaCl+10mM CaCl ₂	6.0	DEAE	43
10	ヒスチジン/NaCl+10mM CaCl ₂	6.8	DEAE	43
11	ヒスチジン/NaCl+10mM CaCl ₂	7.4	DEAE	35
12	ヒスチジン/NaCl+10mM CaCl ₂	8.0	DEAE	16
13	ヒスチジン/NaCl+0.5M リジン +10mM CaCl ₂ +20%ショ糖	6.8	DEAE	6
14	0.01M ヒスチジン/0.1M NaCl	6.8	FIX-M	8

FIX-M= 因子IX-M (JHL) DEAE仕上げカラム前

DEAE= 因子IX-M (JHL) DEAE仕上げカラム後

ARC/A9= ARCアルファナイン-SD

CFIX-SD= ARC CFIX-SD

表3のデータをグラフにして図2に示す。

実施例3が示すところは次の通りである。

(1) 因子IXは不純物によって不安定化される；CFIX-SDはCaCl₂を含む場合も含まない場合もFIX-M/DEAEよりはるかに安定性が低い（5、6番と1、2番の対比）；ARC/A9はCaCl₂を含む場合も含まない場合もFIX-M/DEAEよりはるかに安定性が低い（7、8番と1、2番の対比）；DEAE仕上げを施していないFIX-MはDEAE仕上げを施したものより安定性が低い（14番と2番の対比）。

(2) 因子IXはリジンとグリシンによって不安定化する。

(3) Octapharma社が言及した緩衝液（13番、W091-10439参照）は、本発明の安定性を与えない（13番）。

(4) 因子IXの安定性が最も高くなるpH範囲は6.0～6.8である。

E. 実施例4：非水系液体製剤中の凝固因子IXの安定性

CFIX-M (JHL) は、次に挙げる成分の凍結乾燥混合物として調剤される：

- (1) 38ミリグラム (mg) 凝固因子IX
- (2) 70mg NaCl
- (3) 290mgグリシン
- (4) 8.8mg CaCl₂
- (5) 6mgヒスチジン。

この乾燥混合物の一部 (100mg) を、溶媒の一つ (ポリプロピレングリコール(分子量425)(PPG)；ポリ(ジメチルシロキサン)(PMS)；グリセロール；または水) 900～1000マイクロリットルに、注射器で再懸濁および/または溶解した。次に、それらを100マイクロリットル試料として10本のバイアルに分注し、密閉し、37℃で保温した。因子IX凝固アッセイを実施例1に記述したように行なった。

結果

各試料の安定性を次の表4に示す。

表 4

非水系液体製剤中の因子IXの試験管内安定性

溶媒	半減期 (日)	第14日における最終活性 (元の活性に対するパーセント)
PMS	5.5	23
PPG	14	50
グリセロール	11	36
水	12	29

表4のデータをグラフ化して図6に示す。

これらの結果は次のことを示している：

- (1) PPGは凝固因子IXに最も高い安定性を与える。
- (2) PMSは凝固因子IXに最も低い安定性を与える。

F. 実施例5：非水系液体製剤中の凝固因子VIIIの安定性

凝固因子VIII (Baxter社 AHFM) は凍結乾燥混合物として提供され、これは7.5

mL中に次の最終組成を与える：

- (1) 1000～1200単位の凝固因子VIII (133～160単位/mL)
- (2) ヒトアルブミン, 16.7mg/mL
- (3) ポリエチレングリコール, 2.0mg/mL
- (4) 73ミリモル/リットル ヒスチジン
- (5) 40ミリモル/リットル グリシン。

この粉末100mgを2.5mLの溶媒（ポリプロピレングリコール(分子量425)(PPG)；ポリエチレングリコール(分子量300)(PEG)；または水）に注射器-注射器混合によって再懸濁および/または溶解し、100マイクロリットルずつに分けた。次に、そのバイアルを37℃で保温した。

因子VIII活性アッセイは実施例1で因子IXに使用した方法に従って、ただし因子IX標品の代わりに因子VIII標品としてメガI (Mega I; Office of Biologics Research and Review, メリーランド州ベセズダ) を使用し、因子IX欠乏血漿の代わりに因子VIII枯渇血漿 (Universal Reagents社) を使用して行なった。

結果

各試料の安定性を次の表5に示す。

表 5

非水系液体溶媒中の因子VIIIの試験管内安定性

溶媒	半減期 (日)	最終活性 (元の活性に対するパーセント)
PPG	23	44
PEG	3	0
水	18	29

表5のデータをグラフ化して図7に示す。

これらの結果から、PPGと水がどちらも第7日に活性スパイクを示した後、著しい減少を示すことがわかる。PEGを溶媒にすると、因子VIIIがほとんど直ちに失活し、それに先立って活性スパイクが認められることはない。

この実施例と、非水系液体製剤中の因子IXを用いた上記実施例4は、凝固因子の安定化に非水系溶媒を使用するという考えを検証するための予備実験とみなす

ことができる。PPGまたは水中の因子VIIIと、PPG中の因子IXで認められた第7日における活性のスパイクは、注射器-注射器混合中にこれらの物質が細菌に汚染されることによって起こった活性化が原因だろう。この実験技術は、下記実施例8（表7、図16および図17）および実施例9（図18と図19）に記述するこれ以降の非水系液体製剤での実験では改良、改善された。

G. 実施例6：37℃における因子IX用水系製剤の最適化

pHとカルシウム濃度を最適化するために、DEA仕上げを行なった高純度因子IX-Mを比較的高濃度（2.4mg/mL；600単位/mL）に調製した。これは、このタンパク質が37℃で長期間保温している間に活性化され、断片化される傾向を示す条件である。これらの製剤は10mMヒスチジン、0.1M塩化ナトリウム、および次に挙げる濃度の塩化カルシウムを含有する：10mM、30mMまたは100mM。各製剤のpH値を次のいずれかに調節した：5.8、6.0、6.2。その製剤を滅菌ろ過し、オートクレーブしたポリプロピレン管に無菌的に分注し、37℃で保温した。

各製剤の試料を1週間間隔で採取し、-80℃で凍結した。56日後、すべての試料を融解し、因子IX欠乏血漿を基質とする1段階APTT凝固アッセイにより、因子IX凝固活性を分析した。活性パーセントを保温時間に対してプロットし、試験管内半減期（ $T_{1/2}$ ）を、その曲線が50%活性ラインと交叉する時間（日数）として決定した。

結果

初期凝固活性に対するパーセントの減衰曲線を図8～10に示す。上記3つの各pH値での結果を10mM CaCl_2 についてプロットすると（図8）、凝固活性の半減期は38日と58日の間で変動し、曲線がわずかに二相性を示す（当初数週間にわたって安定した減少を示した後、曲線が徐々に上昇または傾きが変化する）ことから、pH6.2で活性化が起こったのではないかとと思われる。また、30mM CaCl_2 では、活性化の明らかな証拠がpH6.2試料に現われた（図9）。100mM CaCl_2

では、40日後にpH6.0とpH6.2で、活性化と思われるわずかな徴候がある（図10）。下記表6はこれらの半減期値を要約したものであり、減衰曲線のわずかな二相性に基づいて、活性化が起こったと思われるところを示している。

図11、12および13は、上記3つの CaCl_2 濃度を各pH値で比較したものである。pH6.0とpH6.2の両方で100mM CaCl_2 に認められる浅い減衰曲線は、因子IXの活性化を反映しているのかもしれない。この最大濃度の CaCl_2 は、長期安定性には不利かもしれない。また、pH6.2では30mM CaCl_2 に活性化の明らかな証拠があり、この条件も最適ではないかもしれない。

37℃で保温したこれら9種類のpH/ CaCl_2 の組み合わせについて、クーマシーブルー染色したSDS-PAGEゲルを、0日と56日について図14Aに、またすべての時点について図14B、14Cおよび14D（還元ゲル）に示す。ゲルは、還元状態と非還元状態（断片を互いに拘束しあうジスルフィド結合を解くための2-メルカプトエタノールを入れたものと、入れないもの）で操作した。0時点では、100mM CaCl_2 で還元ゲルに高分子量スミアがあった点を除いて（これは非特異的塩効果によるものと思われる）、因子IXはいずれの製剤中でも同じに見えた。その100mM CaCl_2 試料を水で希釈した場合、高分子量スミアは認められなかった（図14D）。第56日では、すべての試料に断片化が認められたが、図14Aの還元ゲルでは、試料間の明らかな相違がはっきりわかった。最も断片化が少なく無傷の単量体の量が最大となる最良の条件は、レーン6～7（pH5.8～6.0で30mM Ca）とレーン9～10（pH5.8～6.0で100mM Ca）に現われた。図14B～14Dの時間的検討から、30mM Caまたはそれ以上かつpH5.8～6.0で、断片化の量が最も少なかったことが確認される。

凝固活性によれば、最適な CaCl_2 濃度は30～100mMであると思われる。しかしpH5.8と6.0において、因子IXの安定性（ $T_{1/2}$ ）は、 CaCl_2 濃度が増大するにつれて増大した。高い CaCl_2 濃度で観察された浅い曲線は、おそらく因子IXの活性化よりもむしろ安定性の向上を示しているのだろう。SDS-PAGEデータは、30mM以上の CaCl_2 濃度がpH5.8または6.0で最良であることを示唆している。過去の結果（非掲載のデータ）は、因子IXの安定性がpH5.5で極めて短いことを示している。

表 6

pH5.8～6.2で10～100mM CaCl_2 を含有する液体製剤中37℃で高純度因子IX（600単位/mL）を保温した場合の因子IX凝固活性 $T_{1/2}$ 値と考える活性化

10mM ヒスチジン, 0.1M NaCl に 下記を加えた製剤	凝固活性半減期		
	pH5.8	pH6.0	pH6.2
10mM CaCl ₂	47	38	58 (活性化?)
30mM CaCl ₂	52	56	? (活性化?)
100mM CaCl ₂	57	>60 (活性化?)	>60 (活性化?)

H. 実施例7: 4℃における因子IX水系製剤の評価

製剤の取扱いとアッセイは実施例6と同様に行なった。様々な濃度の因子IX (25単位/mL~600単位/mL) を含有する6種類の製剤を、10mMヒスチジン, 0.1M NaCl, 10mM CaCl₂, pH6.8を使って調製した。各製剤の試料を低温室(4℃)で保存し、凍結し、凝固活性をアッセイした。

結果

図15は4℃で保温した試料の減衰曲線である。最初の100%活性を超える凝固活性の上昇(これは活性化を示す)が、600単位/mL(70日)、300単位/mL(140日)、200単位/mL(210日)および100単位/mL(410日)で観察される。20単位/mLと50単位/mLでは、410日後まで活性化の証拠は認められなかった。これらの試料には410日の時点で、初期活性の80%以上が残っていた。

I. 実施例8: 因子VIII用非水系製剤

この実施例で使用した凍結乾燥因子VIIIは、Baxter Healthcare社Hyland部門(カリフォルニア州グレンデール)が米国赤十字社献血血漿から調製したヒト抗血友病因子・M法溶媒/洗剤処理品(Antihemophilic Factor, Human, Method M, Solvent and Detergent Treated; AHF-M)である。各実験について、未開封バイアル中の因子VIII凍結乾燥粉末に皮下針で溶媒を無菌的に添加し、その懸濁液を液化させることにより、1バイアルのAHF-M(約1000単位)を10mLの非水系

溶媒に懸濁した。試験した溶媒には、グリセロール、ジメチルスルホキシド(DMSO)、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリエチレングリコール(PEG) 200、PEG300、PEG400、ジプロピレングリコール、トリプロピレングリコール、ポリプロピレングリコール(PPG) 425、PPG725、

PPG1000、PPG2000、PPG3000およびPPG4000が含まれる。各懸濁液を滅菌ポリプロピレン管に無菌的に分注した。そのチューブを37℃で保温し、様々な時点で採取し、希釈し、凝固活性をアッセイした。

結果

いくつかの非水系溶媒（グリセロール、DMSO、エチレングリコール）では、無保温の0時間対照でさえ検出不可能な活性レベルであることから、因子VIII活性が迅速に失活するようであった（表7）。これらの溶媒は、因子VIII希釈試料中に存在する濃度に希釈した場合、この凝固アッセイを阻害しないことがわかった。

ジプロピレングリコール、トリプロピレングリコールおよびポリエチレングリコール中の因子VIIIの凝固活性も迅速に失われ、これら溶媒中での半減期は4日またはそれ以下だった。

これに対し、PPG425、PPG725およびPPG1000中では、因子VIII活性が水に溶解した因子VIIIの活性と同程度に、あるいはそれ以上に維持された（図16；表7）。水溶液中の因子VIIIの半減期が34日であったのに対し、PPG425中での半減期は42日、PPG725中では60日以上、PPG1000中では90日以上であった。

因子VIII凝固活性の半減期をPPGオリゴマーサイズに対してプロットすると、その半減期は約PPG1000（17モノマー単位のオリゴマー）までオリゴマーサイズにほぼ比例した（図17）。より大きいPPGポリマー（PPG2000とPPG3000）も高い安定性を与えたが、これらのポリマーは粘度が高く、試料体積を正確に測定することが困難なので変動が生じた。PPG4000では、安定性が低くなるようだった。

PEG400（オリゴマーサイズ＝4モノマー単位）までのPEGは、因子VIIIの安定化には無効だった（図16；表7）。より高分子量のPEGオリゴマーは室温で固体であるので、評価しなかった。

表 7

37℃の非水系液体製剤に懸濁した因子VIII凍結乾燥品（AHF-M）の
試験管内半減期（ $T_{1/2}$ ，日）

番号	溶媒	T _{1/2} (日)
1	水	34
2	DMSO	0
3	グリセロール	0
4	PPG134 (ジプロピレングリコール)	3
5	PPG192 (トリプロピレングリコール)	4
6	PPG425 (7 量体)	42
7	PPG725 (12 量体)	≥ 60
8	PPG1000 (17 量体)	≥ 90
9	PEG150 (トリエチレングリコール)	0
10	PEG200 (テトラエチレングリコール)	2
11	PEG300 (7 量体)	~3
12	PEG400 (9 量体)	~3

J. 実施例9：因子IX用非水系製剤

因子IX免疫アフィニティー精製品をVirtis社の凍結乾燥器中2.5mLずつ凍結乾燥した。各実験につき、7mgの因子IX乾燥品を10mLの非水系溶媒に懸濁した。試験した溶媒は次の通りである：PEG200、PEG300、PEG400、トリプロピレングリコール、PPG425、PPG725、PPG1000、PPG2000、PPG3000およびPPG4000。各懸濁液を滅菌ポリプロピレン管に無菌的に分注し、それを37℃で様々な時間保温し、採取し、希釈し、凝固活性をアッセイした。

図18に示すように、実施例8で因子VIIIについて得た結果とは対照的に、ポリエチレングリコールは因子IXをいくらか安定化した。PEG300とPEG400がそれぞれ5日未満の半減期を与えたのに対し、PEG200（テトラエチレングリコール）での半減期は17日（これは水溶液中でのT_{1/2}の半分未満である）だった。

ポリプロピレングリコールは因子IXをかなり安定化した。水溶液中での半減期が39日であるのに対して、トリプロピレングリコール中では、半減期が約56

日だった。PPG425、PPG725、PPG1000およびPPG2000中では、半減期が56日以降に達しなかった（図19；不規則性はおそらく試料採取誤差によるのだろう）。

K. 実施例10：移植用ポンプによる凝固因子の試験管内送達

30mLの貯蔵槽容量と2mL/日の送達速度を持つ2つのアローモデル3000ポンプ（Arrow International社、マサチューセッツ州ウォルポール）を使用した。これらのポンプは、くも膜下腔内または肝動脈アクセスを伴う腹部への移植が、米国

において認可されている。

因子VIII (AHF-M) と因子IXの水溶液を、一般的なポンプ充填プロトコールに従ってポンプ隔壁/注入口内に注入した。ポンピング機構を作動させるために各ポンプを37℃の水槽に設置し、内容物を、内部滅菌フィルターを通して排出管経由で収集管内に送った。試料を13日間毎日集め、体積と凝固活性を測定した。

結果

流出液体積はどちらのポンプについても正確に2mL/日に保たれた(図20と図21)。

因子VIII活性は第6日までに95%失われた(図20)。しかしその原因は、AHF-M溶液をポンプに充填する工程中に滅菌性が損なわれたときの細菌の混入によるものであることがわかった(細菌の混入は寒天平板コロニーおよび培養評価によって確認した)。

ポンプからの流出液中の因子IX活性は13日間の作動中つねに比較的一定して減少した(図21)。その半減期は18~20日で、ポリプロピレン管中で観察された半減期の約半分だった。第13日の時点で、流出する活性は出発活性の60%だった。1日あたりの送達された因子IX単位数は、最初の5日間は185~210単位で、第6日~第11日の間は160~170単位に減少し、最後の2日間はさらに110~140単位に減少した(図22)。細菌は、因子IX流出液中には検出されなかった。

L. 実施例11: 移植用ポンプと因子VIIIの生物適合性および移植用ポンプによる因子VIIIの送達

1mL/日の送達速度を持つ2つのアローモデル3000ポンプ (Arrow

International社, カリフォルニア州ウォルポール) に、因子VIIIの滅菌水溶液(復元したAHF-M, ロット番号29355011AA; 80因子VIII凝固単位/mL) を無菌的に充填した。実施例10に記述したように、一方のポンプを37℃の水槽に設置してポンピング機構を作動させ、その内容物を0.2ミクロンフィルター、ガラス製流量絞りおよびシリコンゴム排出力テールを通して収集管中に送った。流出した試料を1~4日毎に集め、凝固活性を1段階APTTアッセイで測定した。

チタン製ポンプ貯蔵槽と因子VIIIの生物適合性を決定するために、充填した第

2のポンプの排出力テーテルに結び目を作って溶液が流出しないようにし、30mLの因子VIII溶液すべてを貯蔵槽内に留めた。その貯蔵槽から滅菌皮下注射針で1～4日ごとに試料を無菌的に採取し、因子VIII凝固活性を上述のように測定した。

結果

ポンプから流出させた因子VIII試料の活性と、静止状態のポンプ貯蔵槽から採取した因子VIII試料の活性は、有意に相違しなかった(図23)。ポンプ流出液の第1試料が示す急落は、ポンプの管系をパージするのに使用した食塩水溶液で流出液が希釈されたためである。

静止状態のチタン製ポンプ貯蔵槽から採取した因子VIIIに関する減衰曲線を、以前の実験でポリプロピレン管中で保温した因子VIIIに関する減衰曲線と比較したところ、減衰はポリプロピレン管中よりポンプ中の方が速かった(図24)。ポリプロピレン管内での半減期が約38日であるのに対し、チタン製貯蔵槽内での生体外半減期は約22日だった。ポンプ貯蔵槽中での減衰の方が速いというこの結果は、試験に使用した条件で貯蔵槽のチタン表面の存在下に因子VIIIの結合、変性または断片化が増大することを反映しているのかもしれない。あるいは、試験管のポリプロピレン表面が、なんらかの未知の機序で因子VIIIを実際に安定化することかもしれない。

因子VIIIをアローモデル3000ポンプのチタン製貯蔵槽中37℃で保温した時に観察される安定性が、因子VIIIをポリプロピレン管中37℃で保温した時に観察される安定性より低いということは、これら2つの素材の因子VIIIとの生物適合性に相違があることを示唆している。しかし、ポンプ貯蔵槽内で静置保温した因

子VIIIの安定性と、ガラス/シリコーンゴム排出力テーテルを通して排出された因子VIIIの安定性には相違は認められなかった。このことから、ガラス表面とゴム表面は、ポンプを出た因子VIIIの活性を変化させないことが示唆される。

M. 実施例12: 移植用ポンプと因子IXの生物適合性および移植用ポンプによる因子IXの送達

実施例11と同様に、1mL/日の送達速度を持つ2つのアローモデル3000ポンプ(

Arrow International社、マサチューセッツ州ウォルポール) に、10mMヒスチジン、0.10M NaCl、10mM CaCl₂、pH6.2に溶解した因子IX免疫精製品(100因子IX凝固単位/mL)の滅菌ろ過水溶液を無菌的に充填した。上述のように、一方のポンプを37℃の水槽に設置してポンピング機構を作動させ、その内容物を0.2ミクロンフィルター、ガラス製流量絞りおよびシリコーンゴム排出力テールを通して収集管に送った。溶出した試料を1~2ごとに集め、因子IX凝固活性を一段階APTTアッセイで測定した。

チタン製ポンプ貯蔵槽と因子IXの生物適合性を決定するために、充填した第2のポンプの排出力テールを結んで溶液が流出しないようにし、30mLの因子IX溶液すべてを貯蔵槽内に留めた。1~2日毎に滅菌皮下注射針で試料を貯蔵槽から無菌的に採取し、因子VIII凝固活性を上述のように測定した。

結果

ポンプから流出させた因子IX試料の活性と、静止状態のポンプ貯蔵槽から採取した因子IX試料の活性は、有意に相違しなかった(図25)。どちらの減衰曲線も、約25日の半減期値に外挿する。

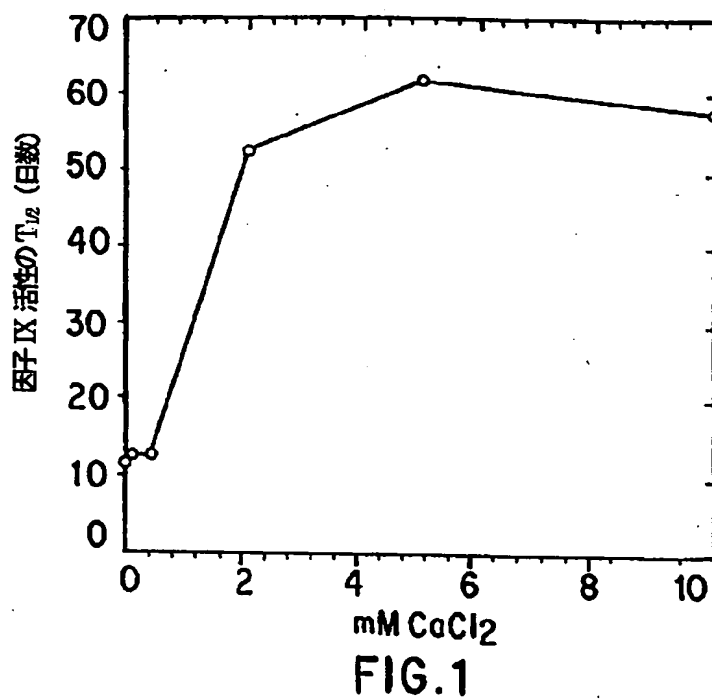
静止状態のチタン製ポンプ貯蔵槽から採取した因子IXに関する減衰曲線を、以前の実験でポリプロピレン中で保温した因子IXに関する減衰曲線と比較したところ、ポリプロピレン管中での半減期が約35日だったのに対し、チタン製貯蔵槽内での生体外半減期は約25日だった(図26)。チタン製貯蔵槽内での半減期の方が短い、減衰速度はチタン製貯蔵槽でもポリプロピレン管でも同様に見える(すなわち減衰曲線の傾きはほぼ同じである)。チタン製貯蔵槽内で因子IXの半減期が短いのは、第1アッセイ時点(第2日)における因子IX活性の初期

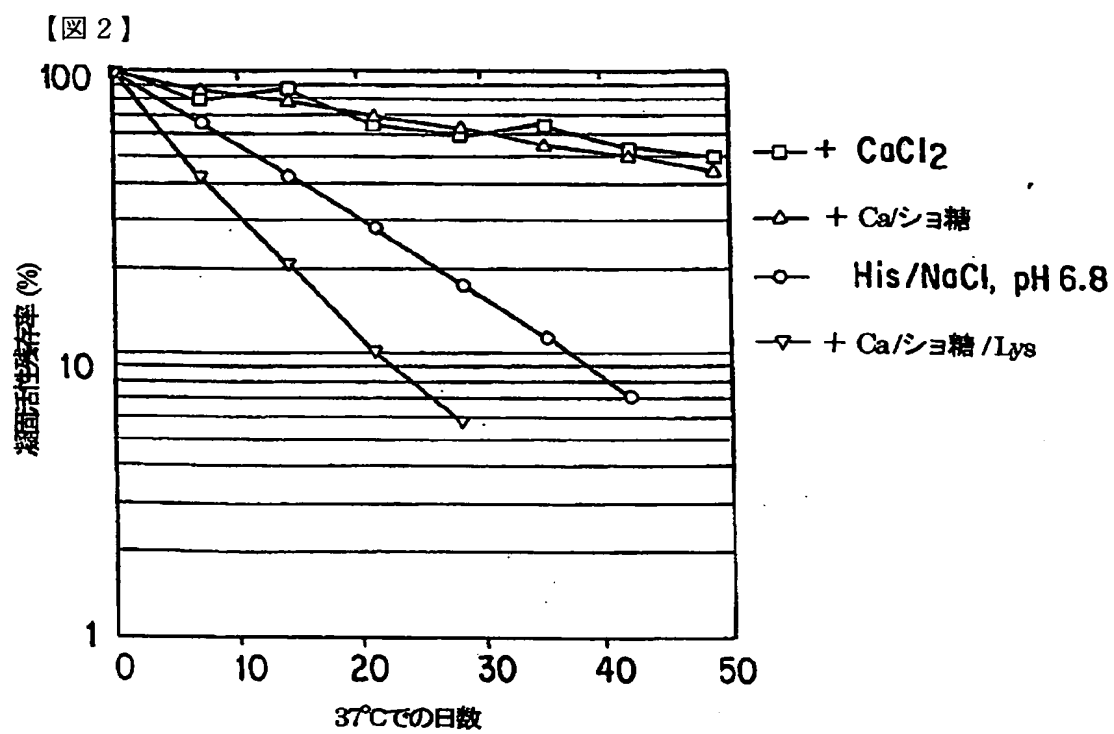
低下(約25%)によるものと思われ、このことは、因子IXの一部がポンプ貯蔵槽の内表面に結合するものの、残りの部分は影響を受けないということを示唆している。

因子VIIIの場合と同様に、ポンプ貯蔵槽内に静置された因子IXとガラス/シリコーンゴム排出力テールを通して排出された因子IXの間には相違が認められず、ガラスとシリコーンゴムがポンプから出た因子IXの効力を変化させないことが

示された。チタン製貯蔵槽中37℃で保温した因子IXの半減期は、ポリプロピレン管中37℃で保温した因子IXの半減期より短い、これはポンプ貯蔵槽内の因子IX内容物の初期低下によるものと思われ、その後はどちらの素材についてもほぼ同じ速度で減衰した。

【図1】





【図3】

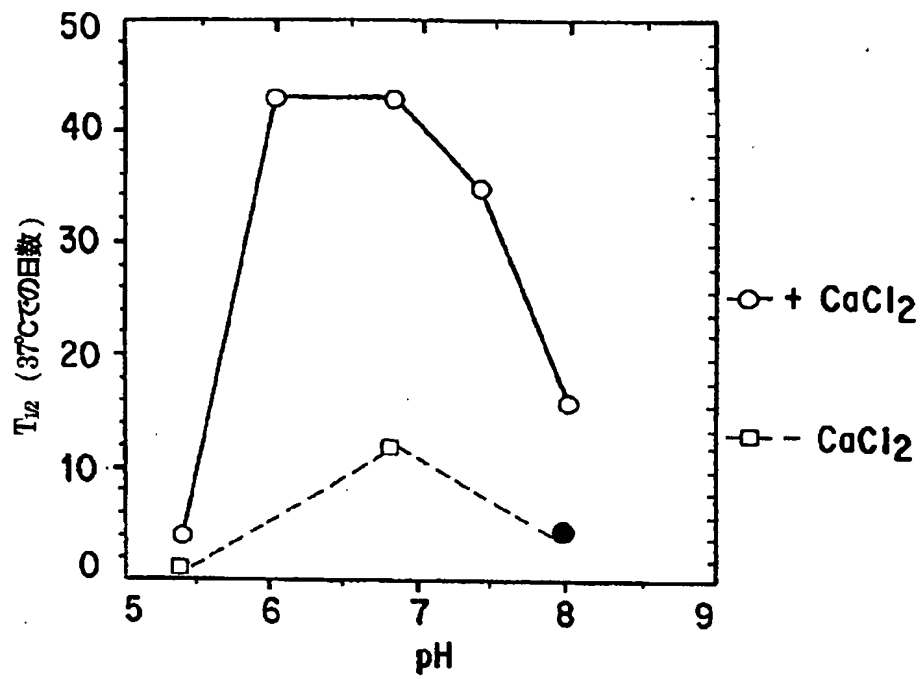


FIG.3

【図4】

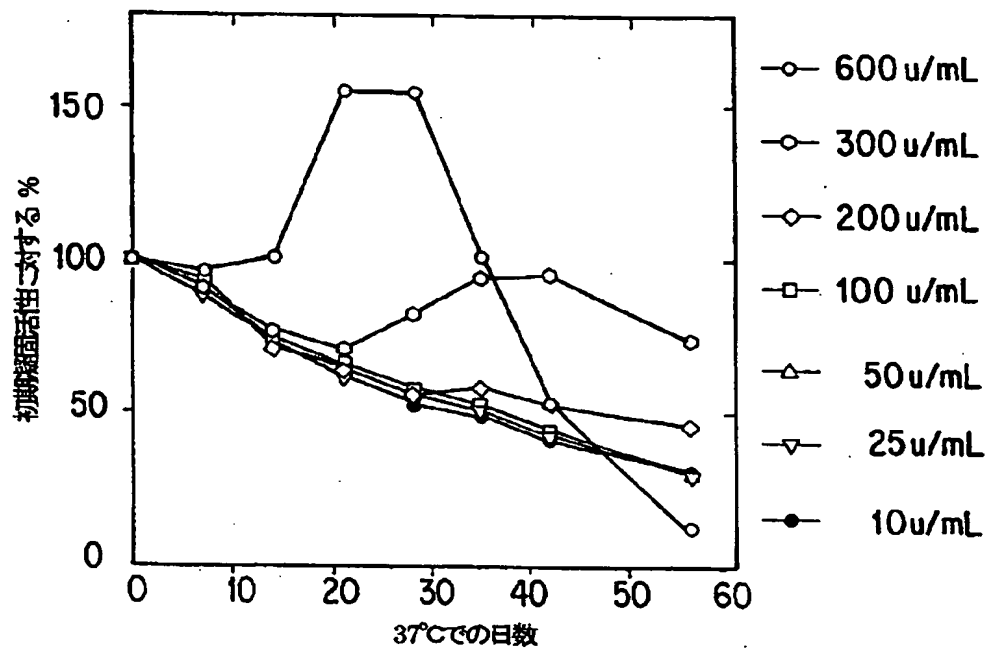


FIG. 4

【図5】

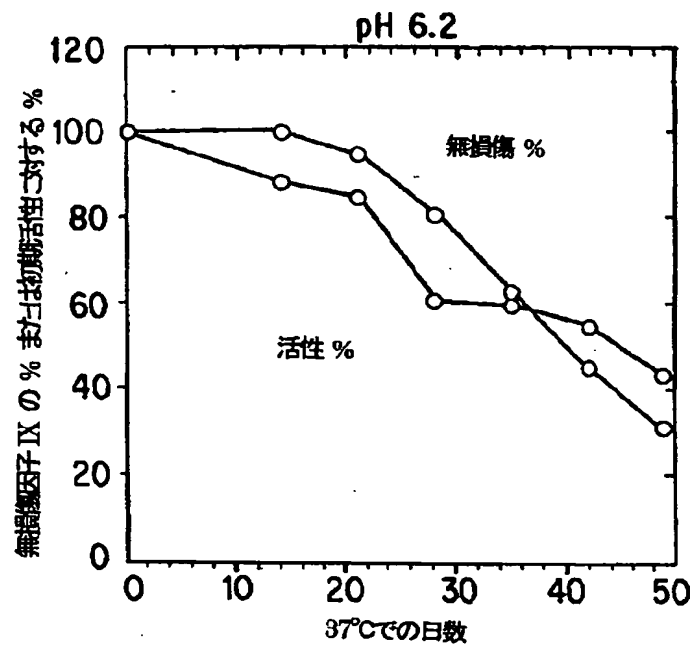


FIG. 5A

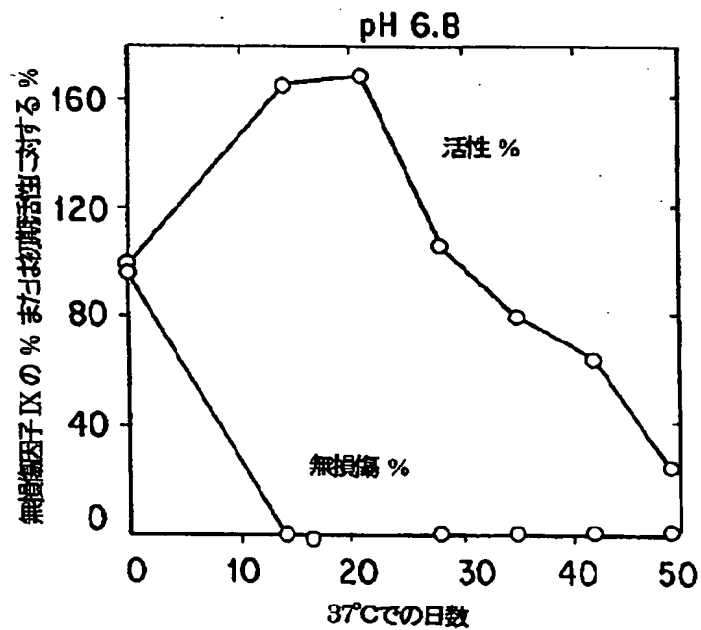


FIG. 5B

【図6】

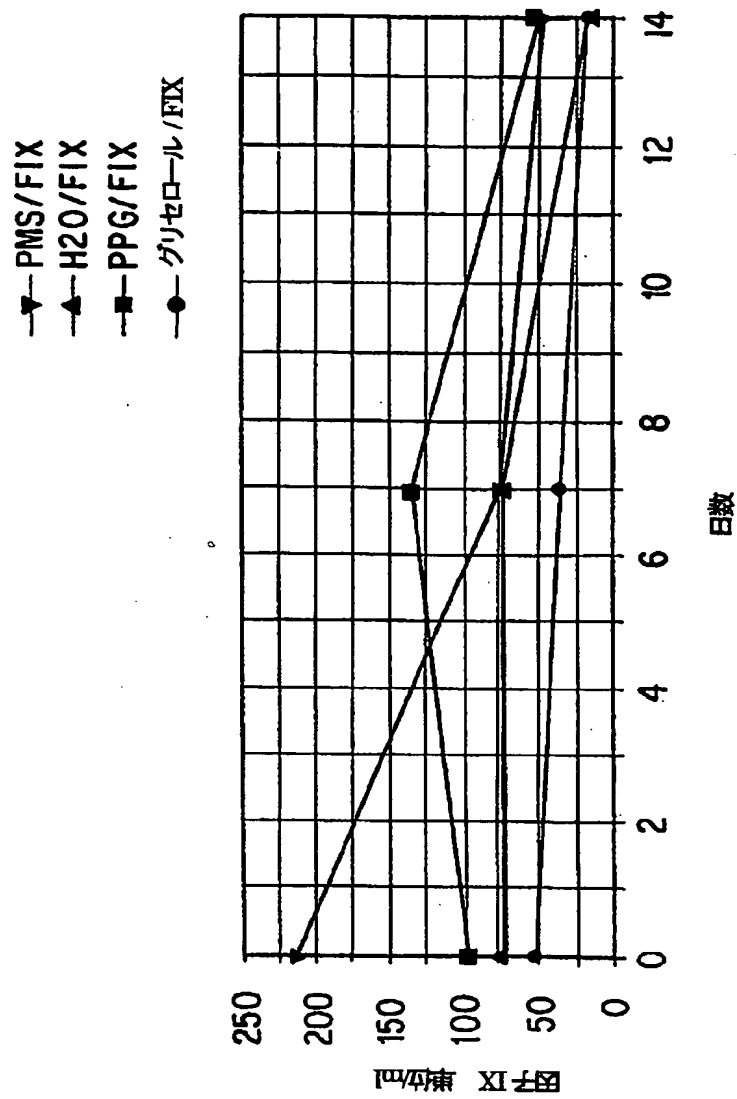


FIG. 6

【図7】

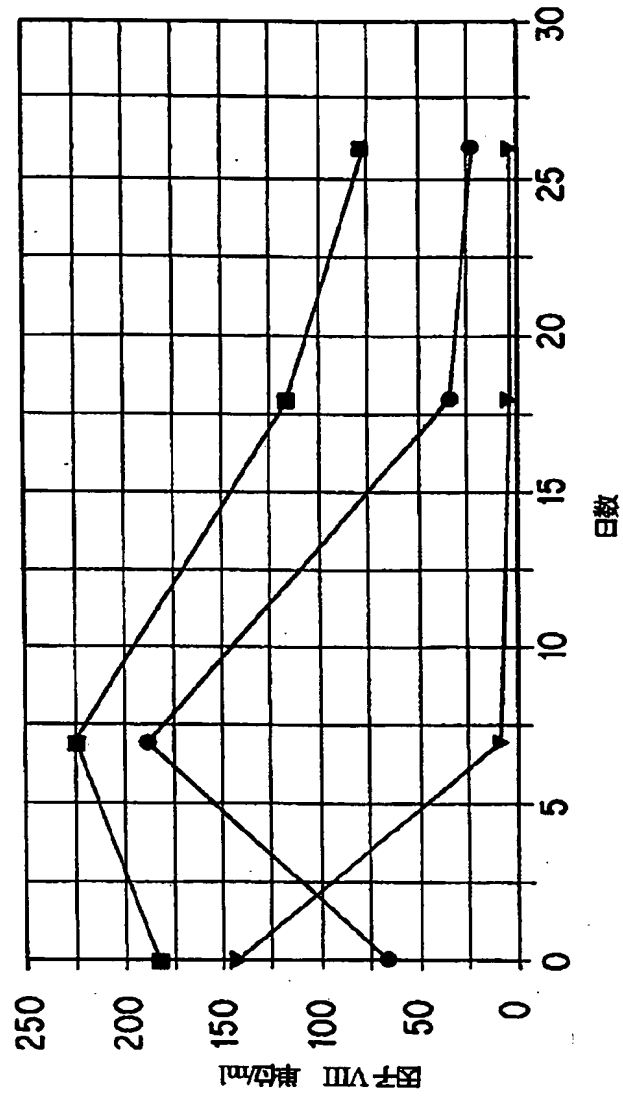


FIG. 7

【図8】

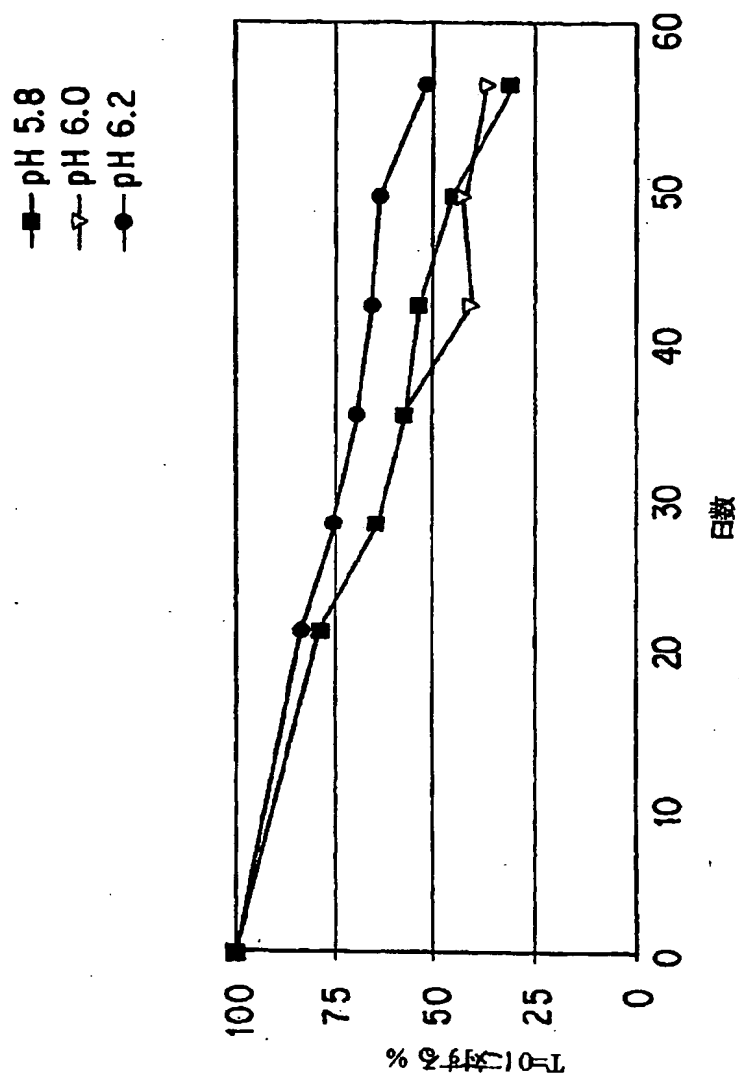


FIG. 8

【図9】

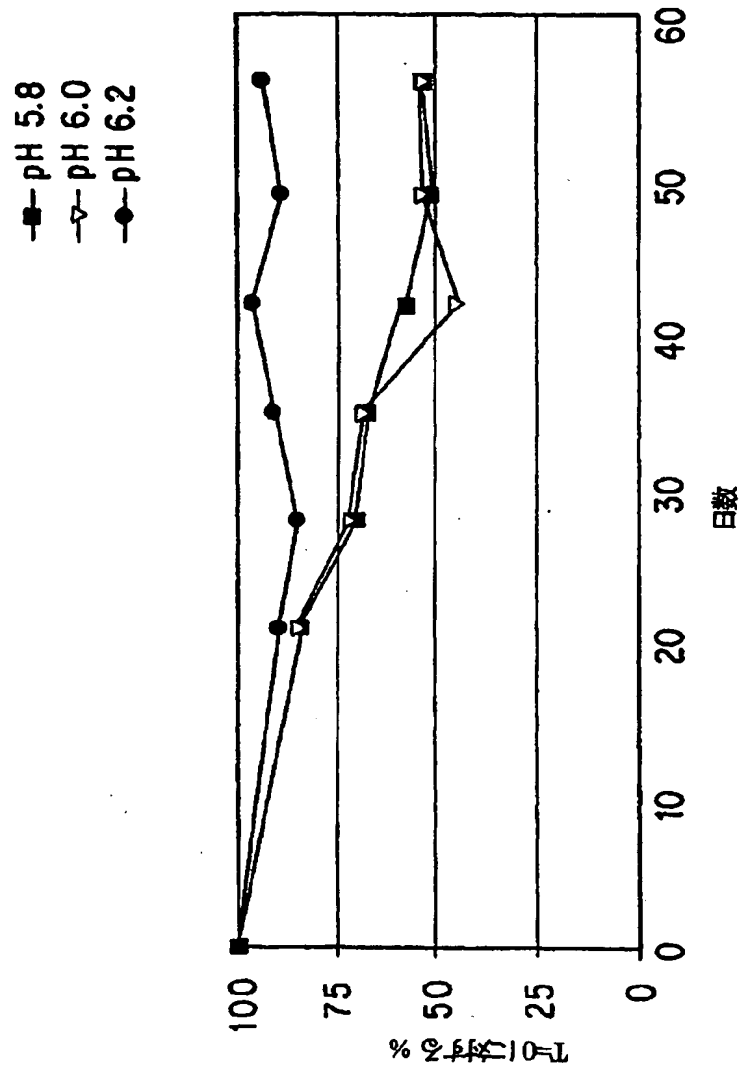
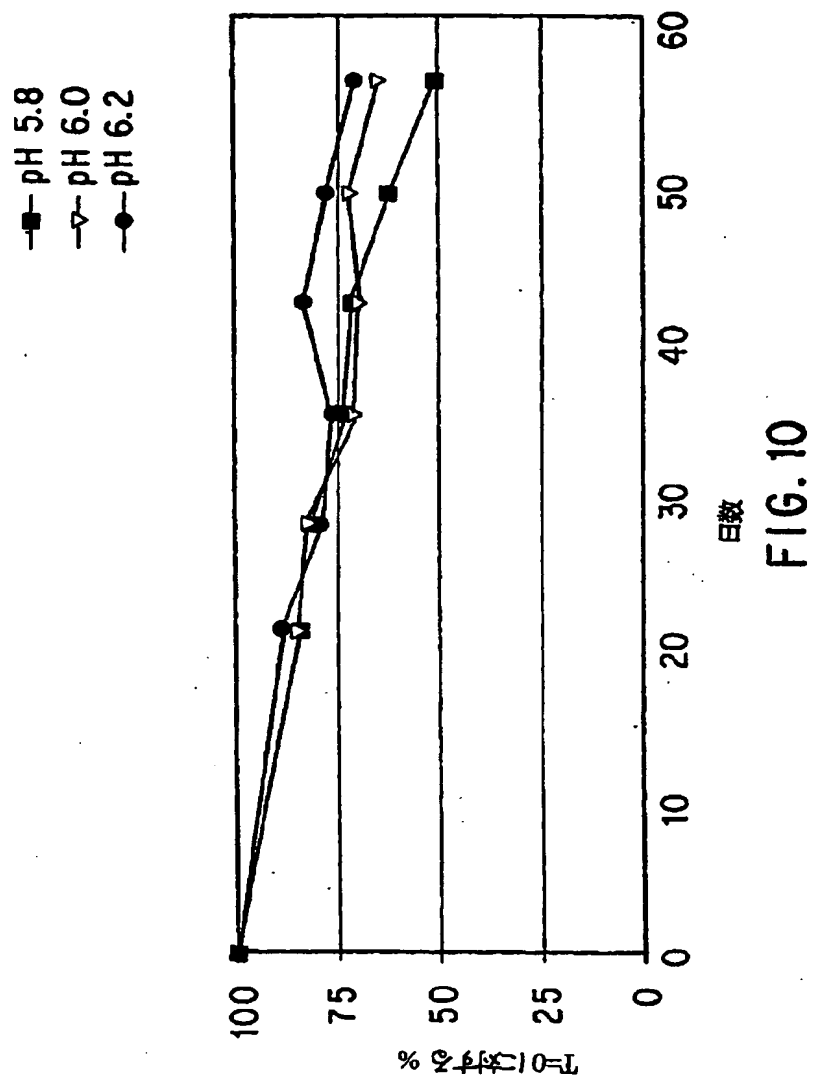


FIG. 9

【図10】



【図11】

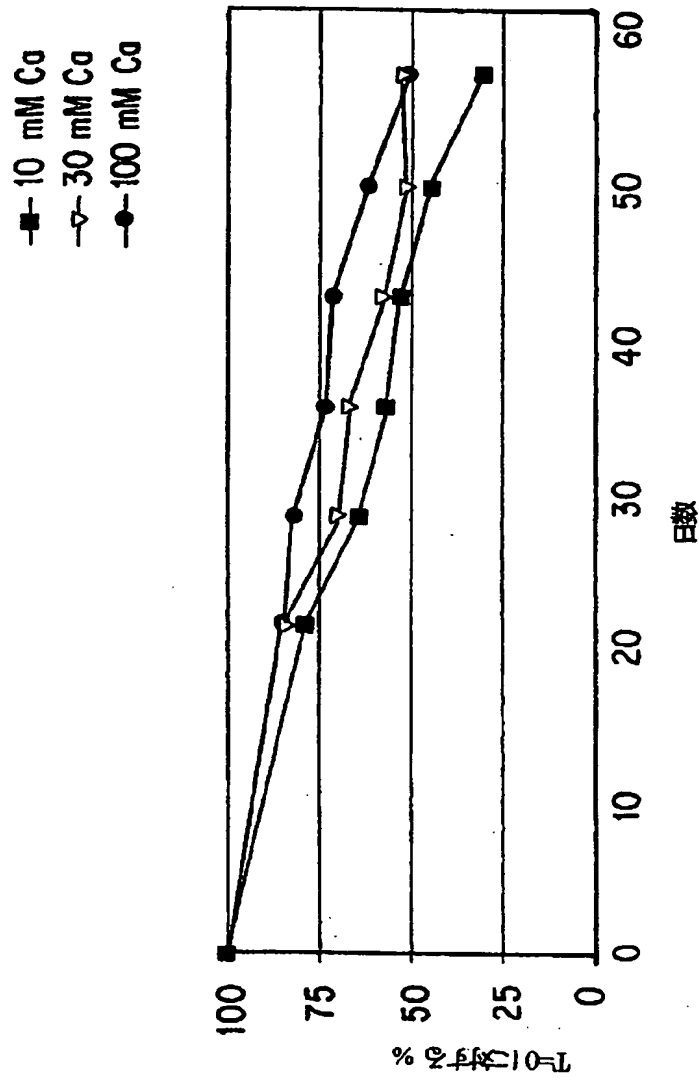
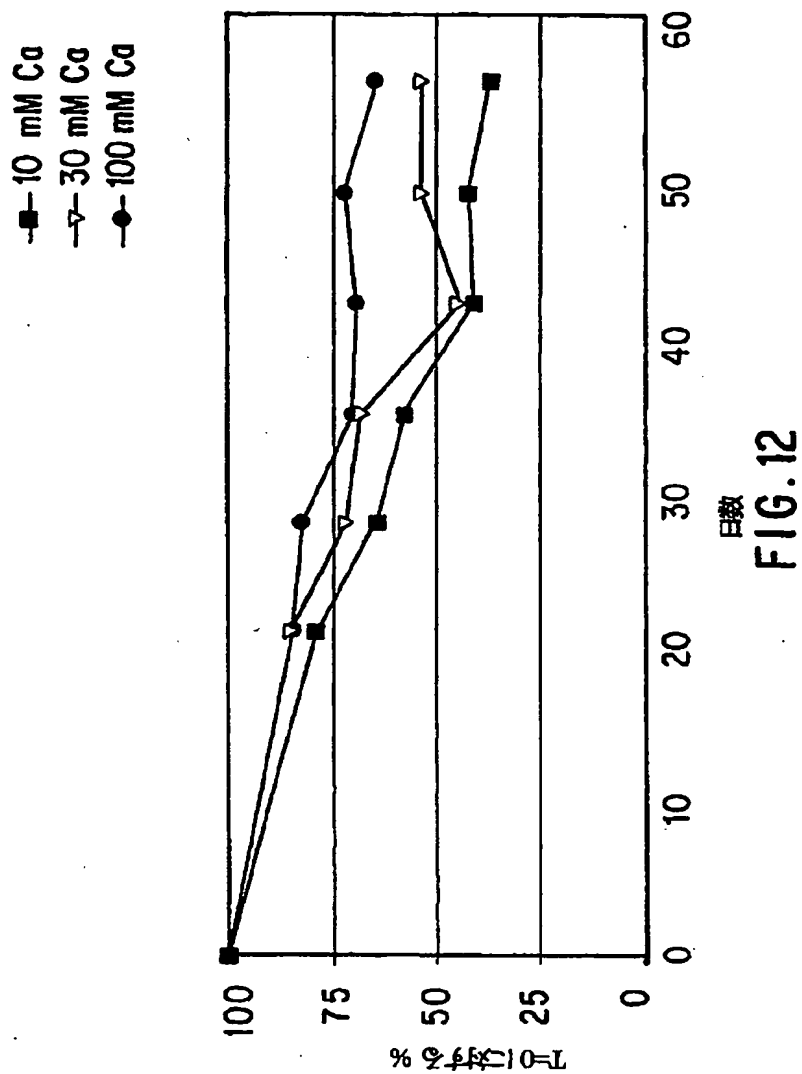


FIG.11

【図12】



【図13】

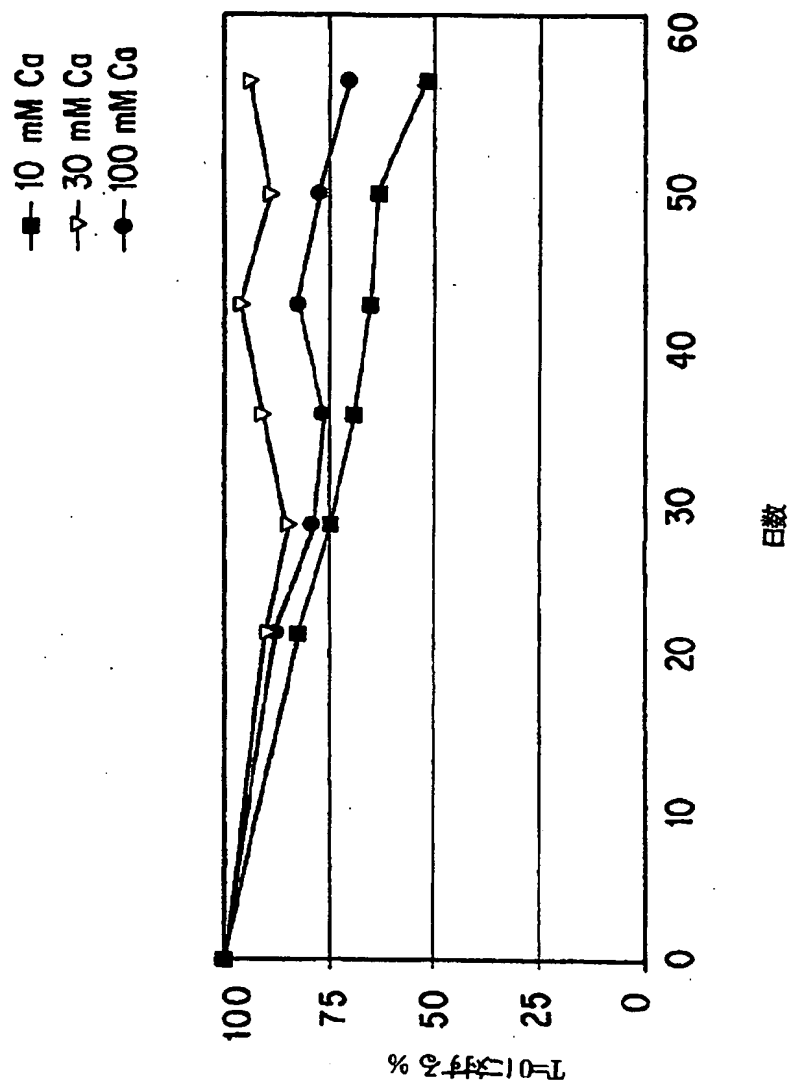


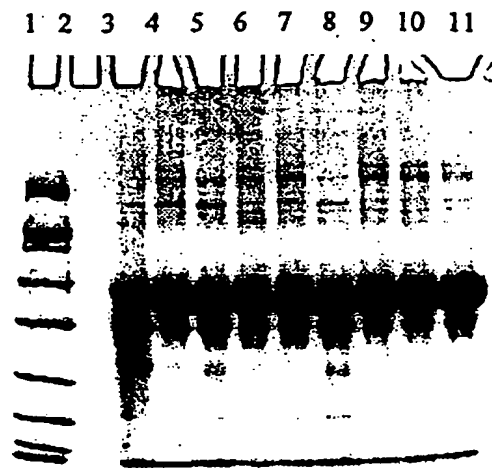
FIG.13

【図14】



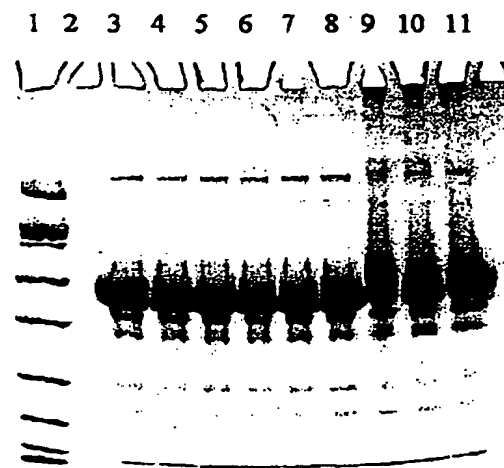
第0日 非還元

FIG. 14A



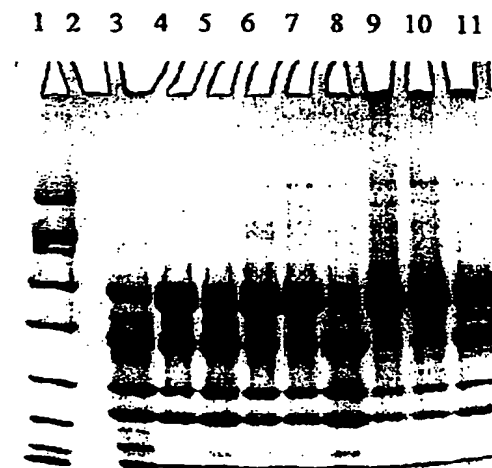
第56日 非還元

FIG. 14B



第0日 還元

FIG. 14C



第56日 還元

FIG. 14D

【図14】

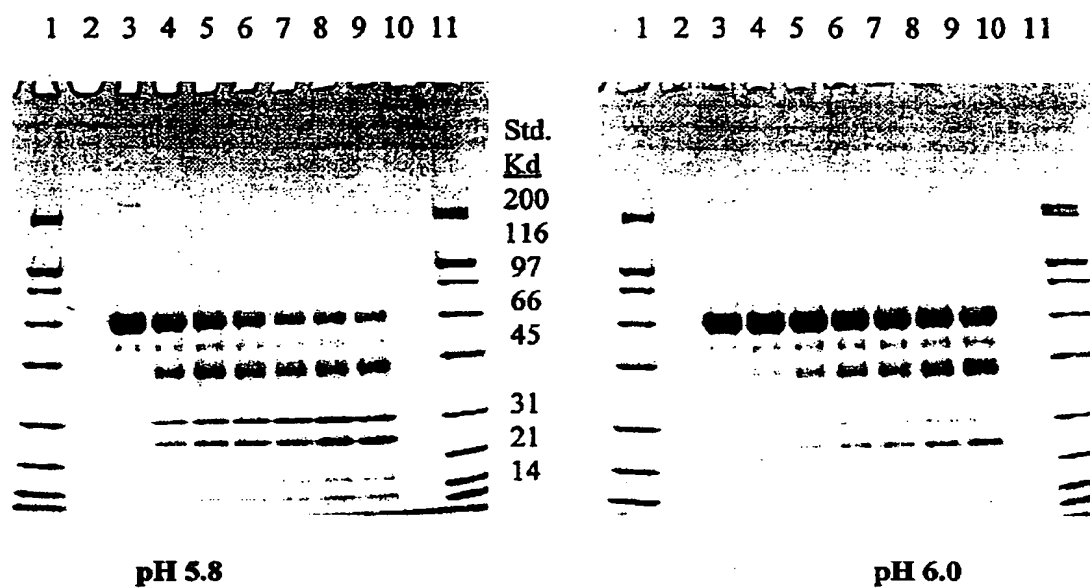


FIG. 14E

FIG. 14F

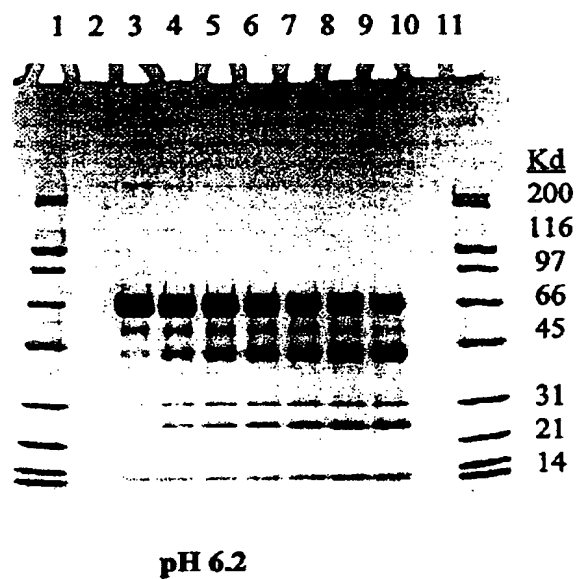


FIG. 14G

【図14】

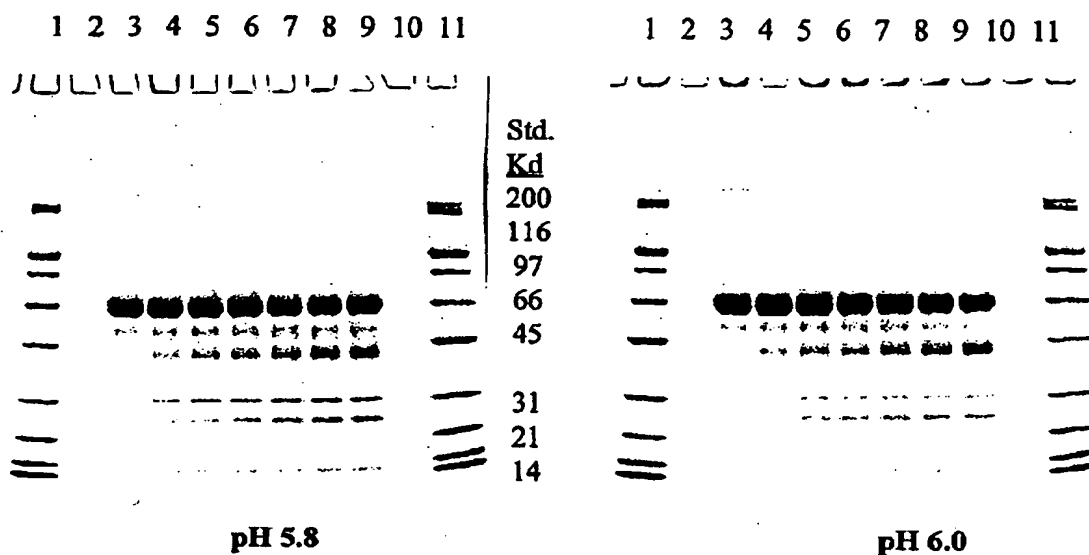


FIG. 14H

FIG. 14I

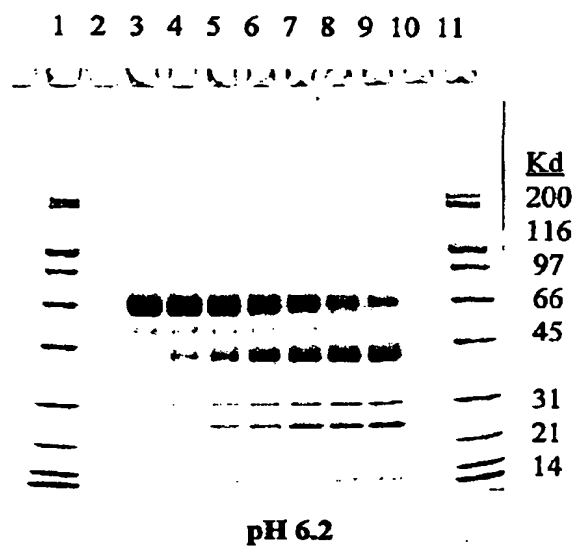
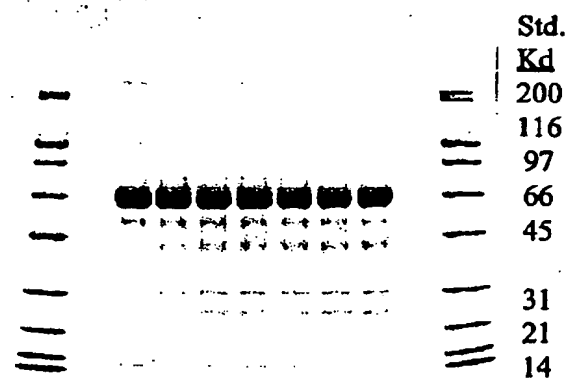


FIG. 14J

【図14】

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

J J J J J J J J J J J J J

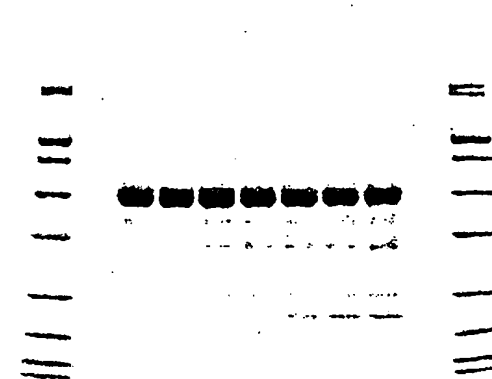


pH 5.8

FIG. 14K

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

J J J J J J J J J J J J J

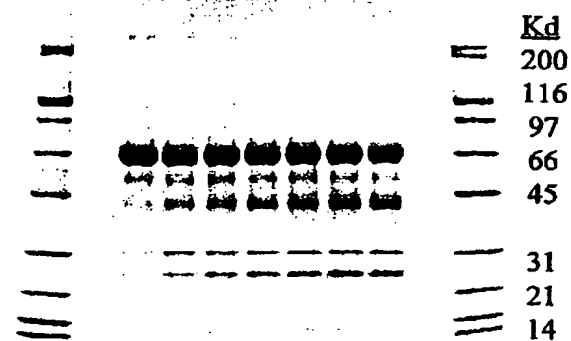


pH 6.0

FIG. 14L

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

J J J J J J J J J J J J J



pH 6.2

FIG. 14M

【図15】

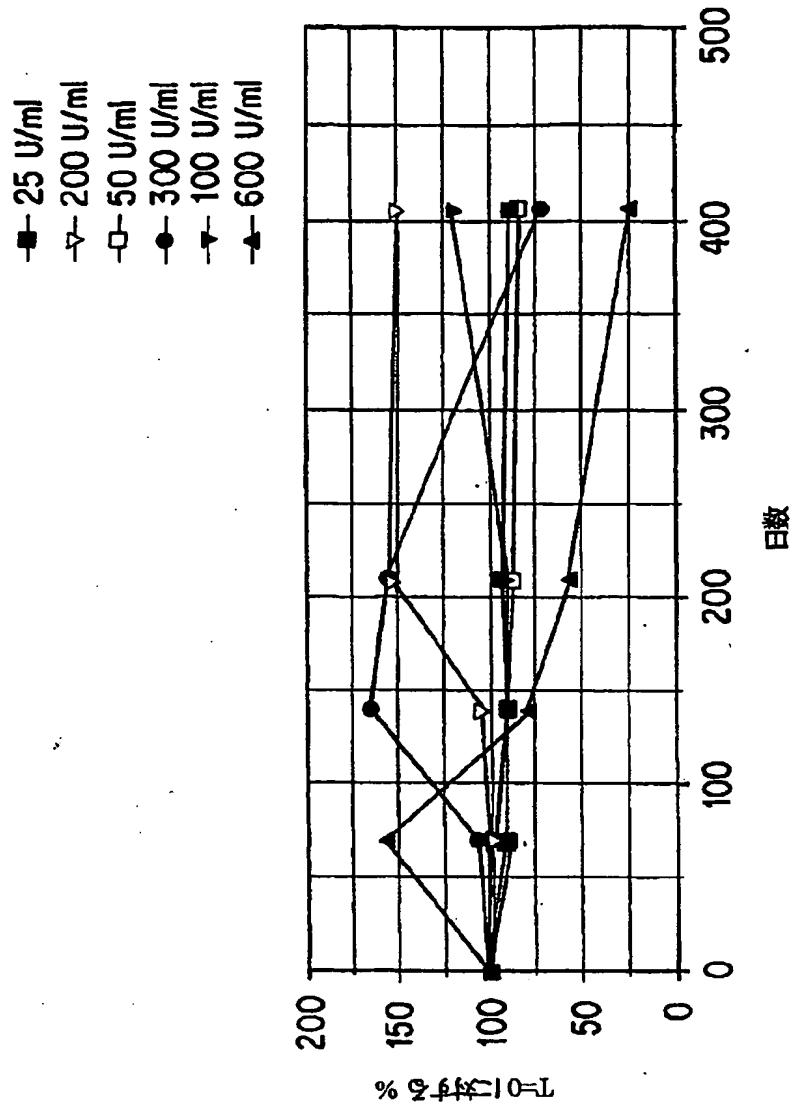


FIG.15

【図16】

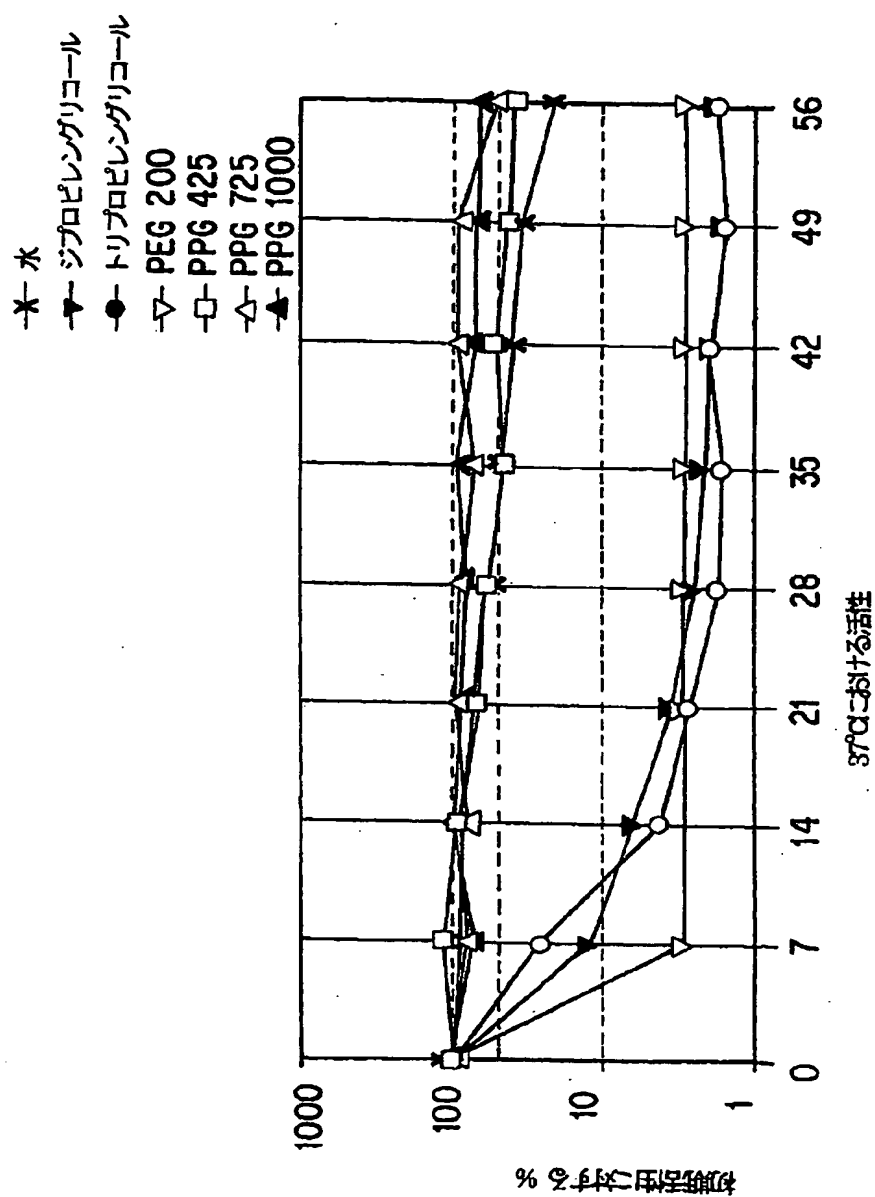


FIG.16

【図17】

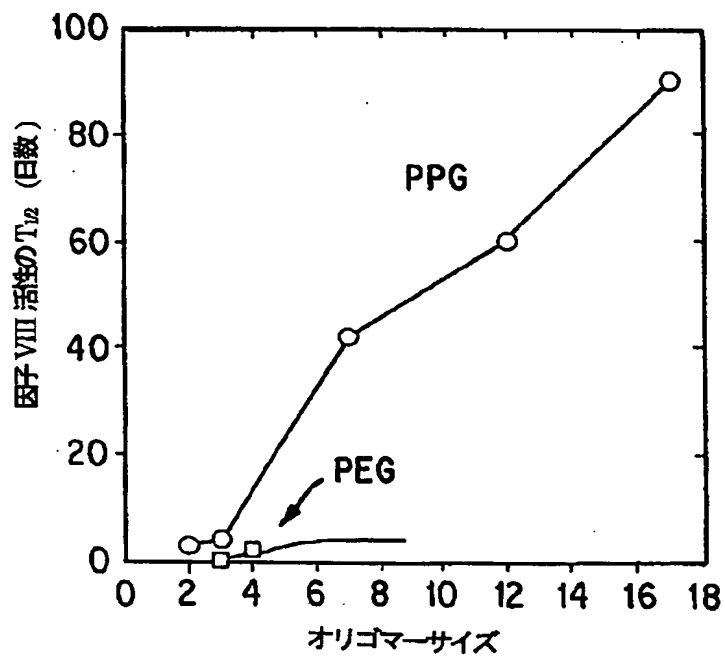


FIG.17

【図18】

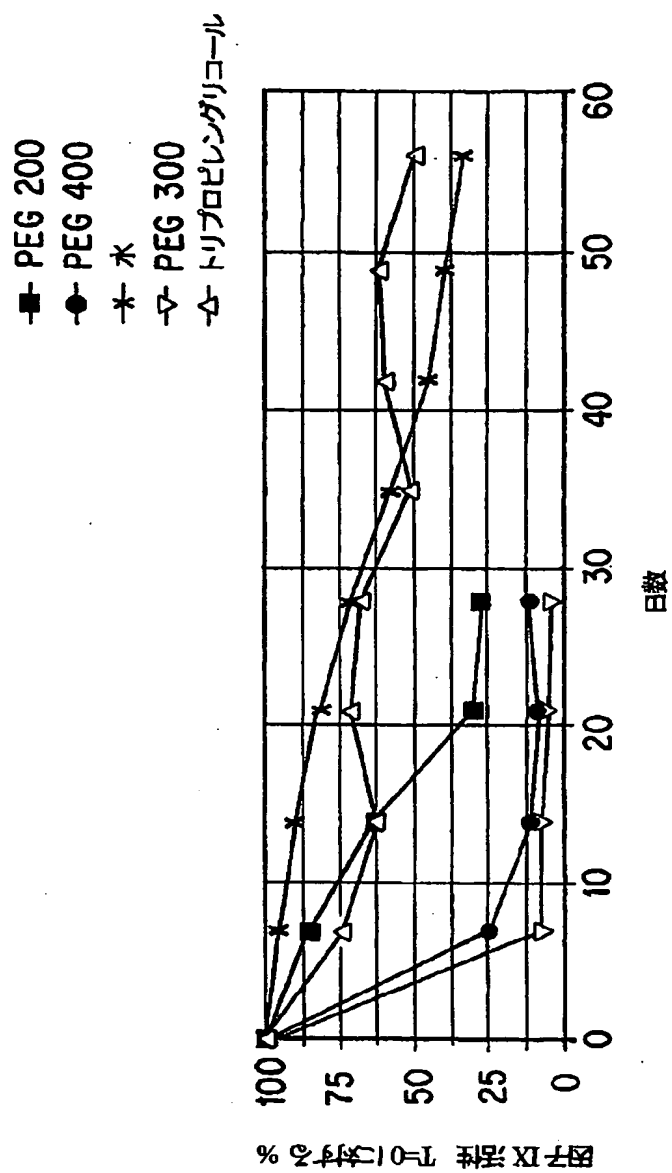


FIG.18

【図19】

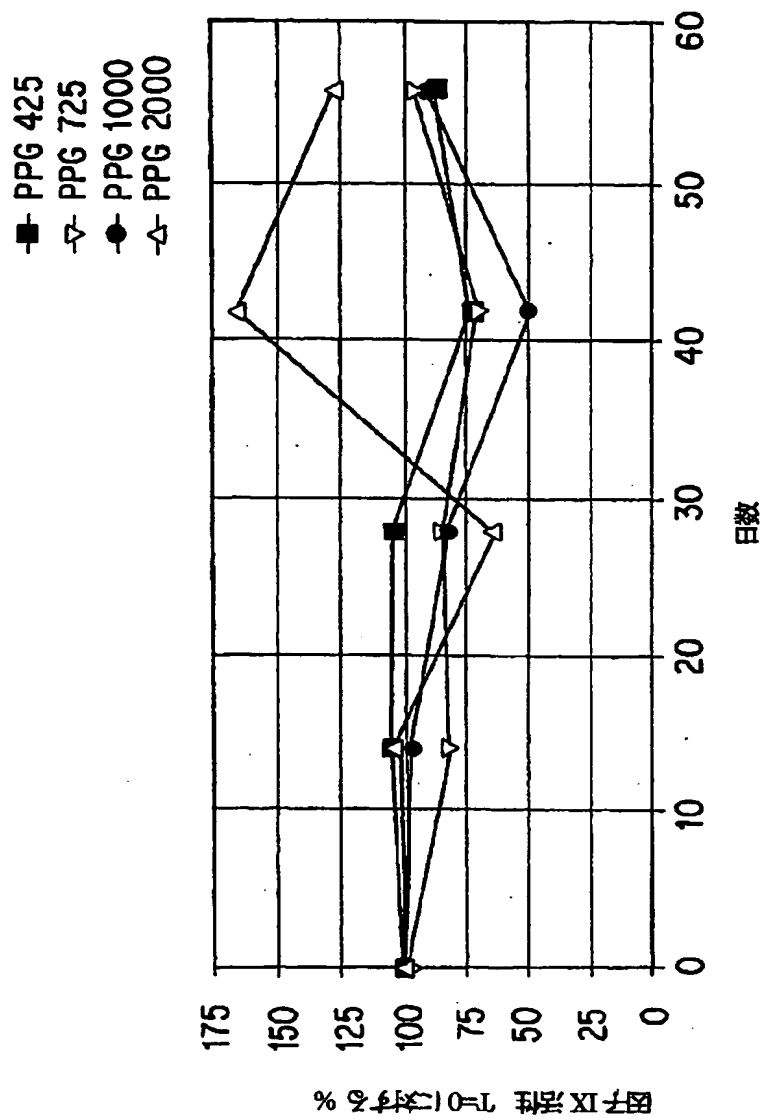


FIG.19

【図20】

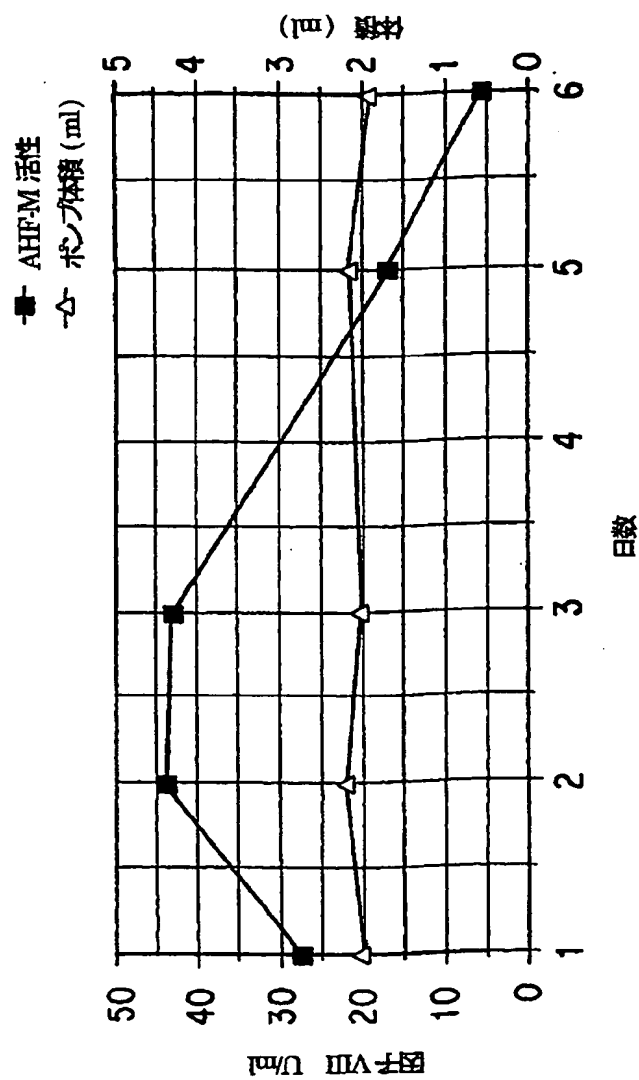
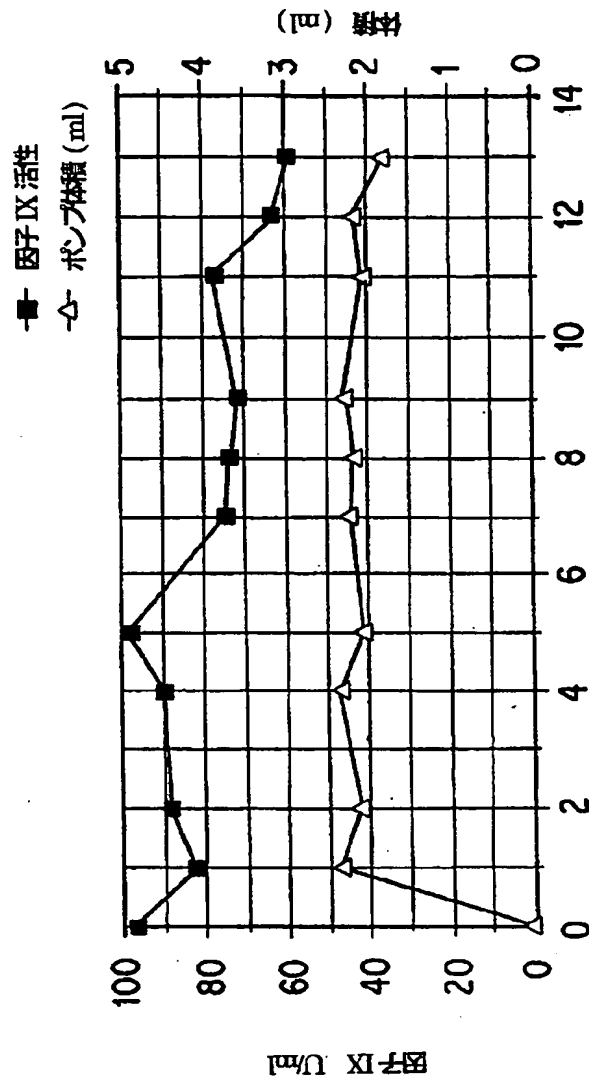


FIG. 20

【図21】



日数

FIG. 21

【図22】

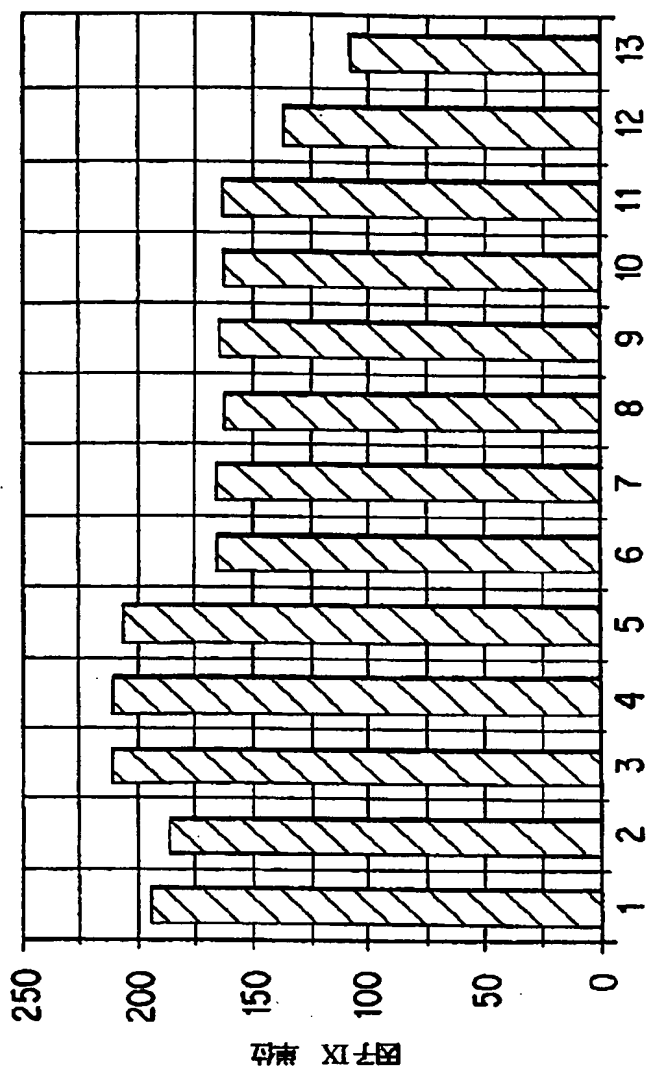


FIG.22

【図23】

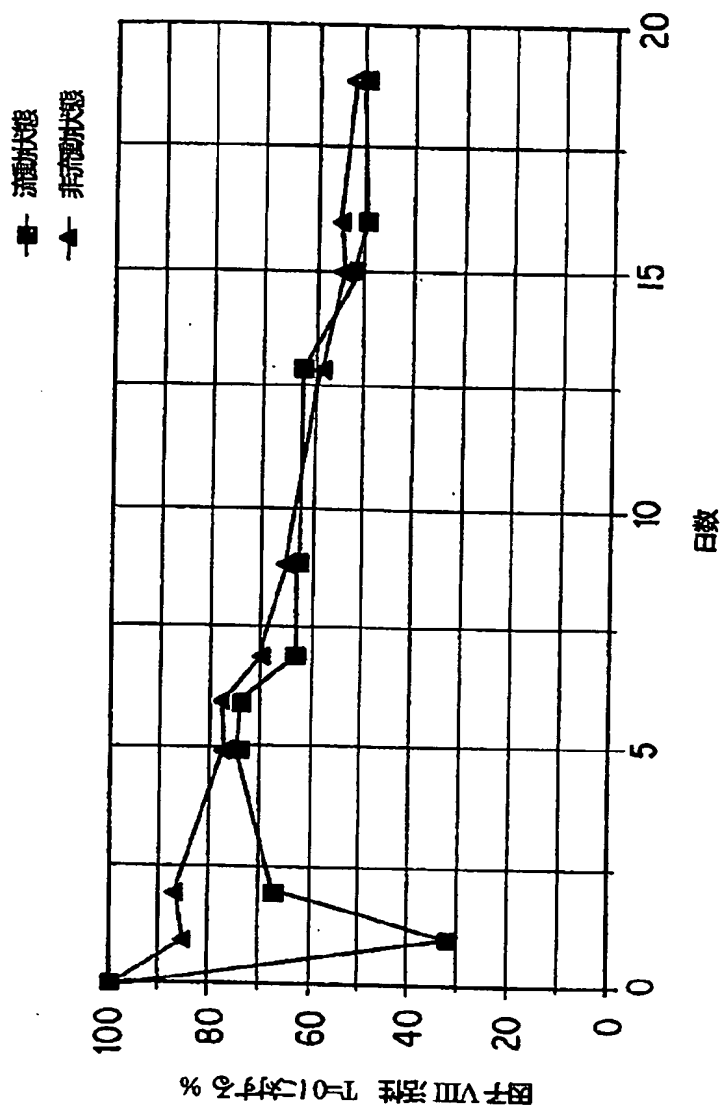


FIG. 23

【図24】

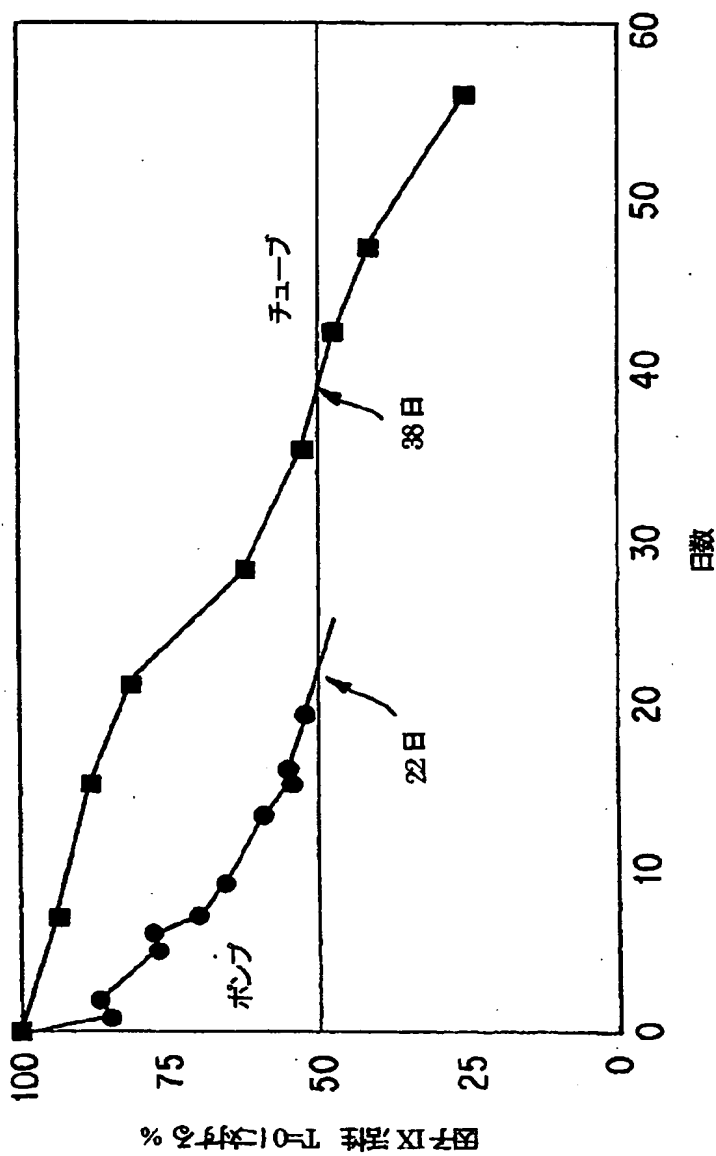


FIG. 24

【図 25】

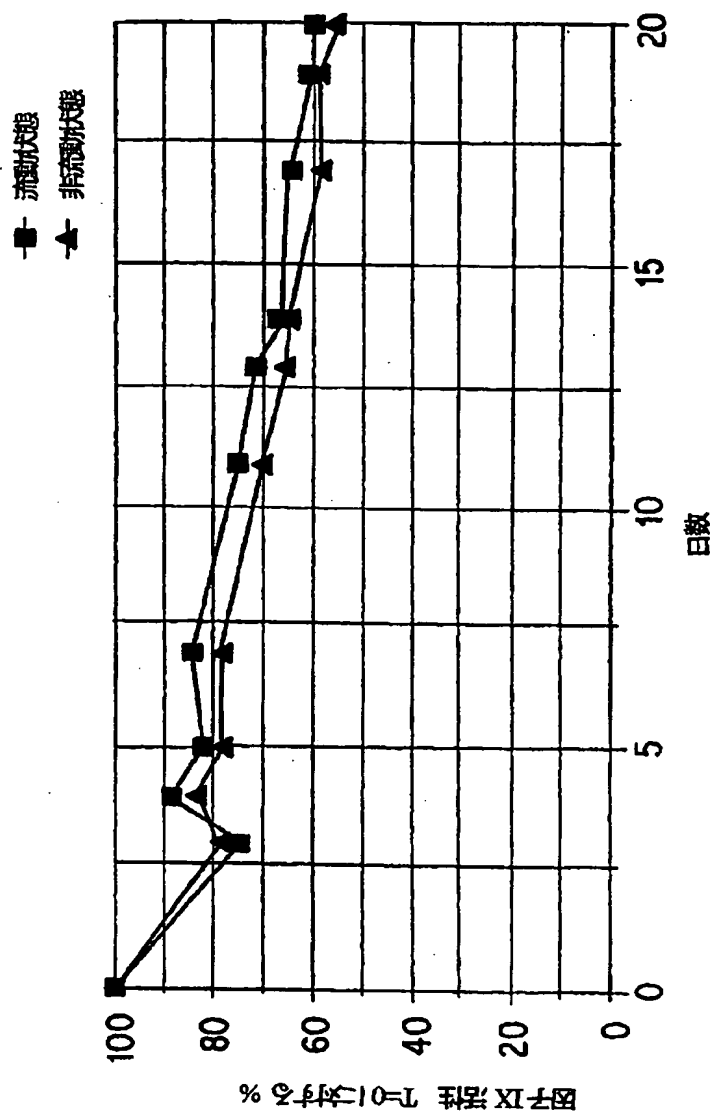


FIG.25

【図26】

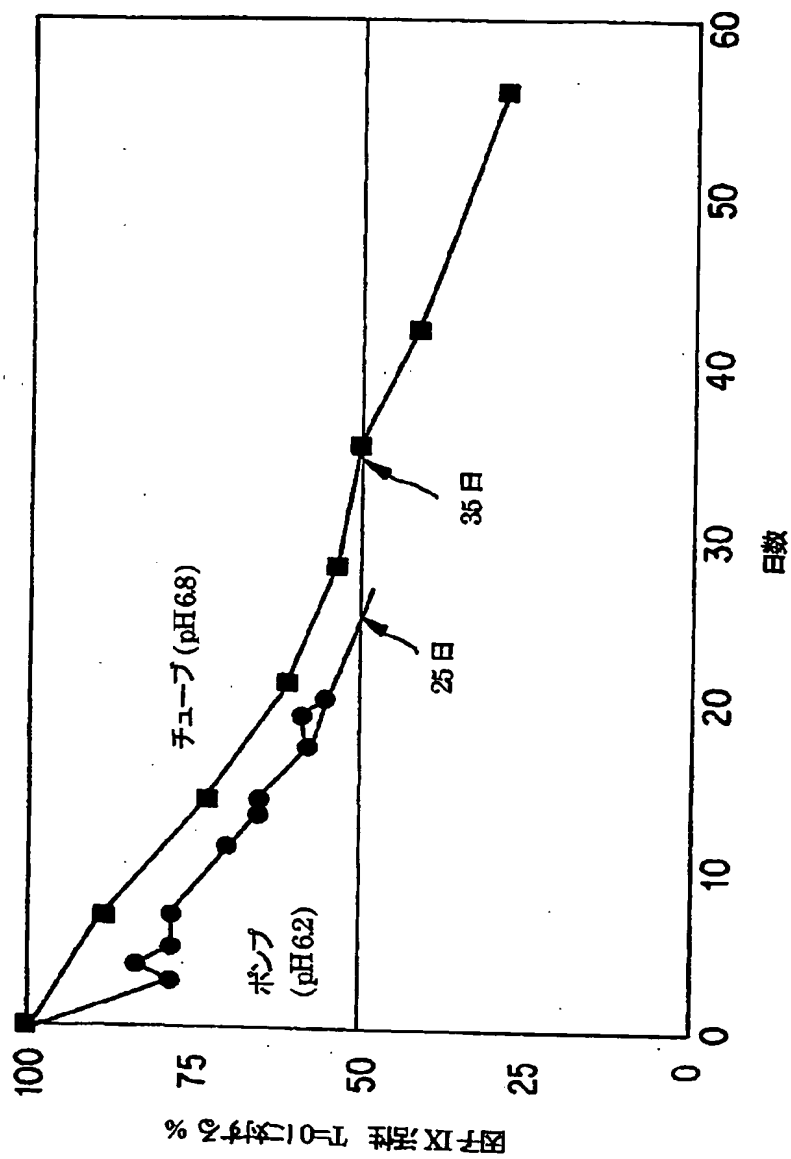


FIG.26

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/19251

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : A61K 35/14, 38/00 US CL : 530/380, 383, 384, 829; 514/21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/380, 383, 384, 829; 514/21 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 5,055,557 (ZIMMERMAN) 08 October 1991, column 2, lines 36-41; column 6, lines 61-68 and column 7, lines 45-50.	1-4 and 9-10
Y	US, A 4,447,416 (MENACHE-ARONSON ET AL.) 08 May 1984, column 2, line 50 to column 3, line 28; Example 1; claims 7 and 12.	1-4, 9-10 and 11-15
Y	US, A, 3,560,475 (FEKETE ET AL.) 02 February 1971, column 2, line 35 to column 3, line 70.	1-4 and 11-15
Y	US, A, 5,259,951 (ARRIGHI ET AL.) 09 November 1993 columns 2-3.	1-2, 5-6, 9-13 and 16-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
05 FEBRUARY 1997		19 MAR 1997
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231		Authorized officer ABDEL A. MOHAMED <i>JAB for</i>
Facsimile No. (703) 305-3230		Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/19251

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 5,288,853 (BHATTACHARVA ET AL.) 22 February 1994, Abstract, columns 2-4 and columns 7-9.	1-2, 5-13 and 16-18
Y	US, A, 5,110,907 (KOSOW ET AL.) 05 May 1992, column 2, line 57 to column 5, line 17 and column 6, line 59 to column 8, line 68.	1-2, 5-6, 9-13 and 16-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US96/19251

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, CAS ONLINE, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, DERWENT AND DIALOG

Search terms: plasma proteins; vitamin K-dependent plasma proteins; Factors II, VII, IX and X; Proteins C, S and Z; Factor VIII and von Willebrand Factor; Polyvalent or divalent metal ions; Aqueous solutions; Hsuidine; NaCl or CaCl₂; Polyethylene glycol or PEG; Dimethyl sulfoxide or DMSO and congenial or acquired deficiencies of plasma proteins.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 7/00		A 6 1 P 43/00	
43/00		A 6 1 K 37/24	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP		
(72)発明者	ミエッカ, シャーリー・アイ アメリカ合衆国20878メリーランド州 ゲ イザースバーグ、クローバー・ノウル・ロ ード11905番		
(72)発明者	ドローハン, ウィリアム・エヌ アメリカ合衆国22152バージニア州 スブ リングフィールド、オークフォード・ドラ イブ8417番		
(72)発明者	ジェイムソン, トーマス・アール アメリカ合衆国20879メリーランド州 ゲ イザースバーグ、グレイジング・ウェイ 20238番		
(72)発明者	テイラー, ジョン・アール・ジュニア アメリカ合衆国10012ニューヨーク州 ニ ューヨーク、イースト・シックスティエイ ス・ストリート12番		
(72)発明者	シン, マニッシュ アメリカ合衆国92122カリフォルニア州 サンディエゴ、ショアーライン・ドライブ 7234番、ナンバー150		
(72)発明者	マックフィー, マーティン・ジェイ アメリカ合衆国20879メリーランド州 ゲ イザースバーグ、レイク・ランディング・ ロード9971番		